



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

Enfermedad de Newcastle

TESINA

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Magali MORA CHANGANAQUÍ

Lima, Perú

2005



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Mora, M. Enfermedad de Newcastle [Tesina]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, EAP. de Medicina Veterinaria; 2005.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMERICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADEMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**PROGRAMA DE TUTORIA EN INVESTIGACIÓN PARA
OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO POR LA
MODALIDAD DE EXAMEN DE APTITUD PROFESIONAL**

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **Viernes 04 de Noviembre del 2005**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **N.º008-PROGR-TUTORIA/FMV-05**, integrado por los siguientes profesores:

ALBERTO MANCHEGO SAYÁN,
ELIANA ICOCHEA D'ARRIGO,
MÓNICA ALBA CHINCHA,
MARIA VÁSQUEZ CACHAY,

Presidente del Jurado
Directora de la Tutoría
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **Magali Mora Changanáquí**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente el tema:

"ENFERMEDAD DE NEWCASTLE "

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Directora de la Tutoría y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECIOCHO (18)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:30 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

.....
Alberto Manchego Sayán; MV. Prof. Asociado, D.E.

.....
Eliana Icochea D'Arrigo; M.V. Prof. Principal, D.E.

.....
Mónica Alba Chinchá; MV. Prof. Auxiliar, D.E.

.....
María Vásquez Cachay; MV. Prof. Auxiliar, T.C.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA

Facultad de Medicina Veterinaria

ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral:

N.º 008-PROGR-TUTORIA/FMV-2005.

PRESIDENTE :
ALBERTO MANCHEGO SAYÁN

MIEMBROS :
ELIANA ICOCHEA D`ARRIGO
Directora de la Tutoría

:
MÓNICA ALBA CHINCHA

:
MARIA VÁSQUEZ CACHAY

San Borja, 04 de Noviembre del 2005

Vº B.

.....
DR. ARMANDO GONZÁLEZ ZARIQUIEY
Director de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria

A mis viejos

RESUMEN

La Enfermedad de Newcastle (ENC) es uno de los problemas más importantes en la avicultura comercial y esta incluida dentro de la lista de enfermedades de notificación obligatoria ante la Oficina Internacional de Epizootias (OIE); en la actualidad sigue siendo una de las principales barreras sanitarias a nivel mundial. Es definida como la infección causada por un Paramixovirus Aviar-1 (APVM-1) con un ICPI de 0.7 o mayor o por poseer múltiples aminoácidos básicos en el lugar de división de la proteína de fusión (F). Más de 250 especies de aves han demostrado ser susceptibles a la infección por lo que parece razonable concluir que la mayor parte de las aves, si no todas, son susceptibles a la infección; se han reconocido infecciones en todos los continentes, los cuadros clínicos que induce varían con la virulencia de la cepa, la especie de ave afectada y la predilección que tenga el virus para diseminarse por los tractos respiratorio, digestivo o nervioso, dentro de otros factores. Este documento comprende una vasta y actualizada revisión bibliográfica que reúne información de la historia de la enfermedad, su importancia económica y en salud pública, los aspectos relacionados al agente mismo, características de las cepas de alta y baja virulencia, patología y epidemiología, interpretación de análisis serológicos, así como los métodos de diagnóstico, prevención y control en aves de crianza tecnificada. En un capítulo aparte se puede encontrar información sobre la enfermedad en aves silvestres, la que incluye la presentación de la enfermedad clínica, el diagnóstico, la prevención y el control de la misma, recalcando las principales diferencias que presenta frente a las aves comerciales, adicionalmente, en la parte final del trabajo se puede encontrar información recopilada en el Perú que incluye no sólo datos estadísticos detallados de los brotes y aislamientos de los últimos 15 años, sino también las principales regulaciones impuestas por el SENASA, programas de vacunación recomendadas para nuestro medio y la situación actual de la enfermedad en nuestro país. El principal objetivo de esta revisión bibliográfica es lograr un documento que sirva como material de consulta básico que incluye información esencial para el entendimiento de la enfermedad.

SUMMARY

Newcastle disease (ENC) is one of the most important problems affecting the poultry industry and it is included in the list of diseases of obligatory notification to the Office International des Epizooties (OIE); at the present time it continues being one of the main sanitary barriers world-wide. It is defined as the infection caused by an Avian Paramyxovirus type 1 (APMV-1) with an ICPI of 0.7 or greater or where the presence of multiple basic aminoacids at the cleavage site of fusion protein (F) has been demonstrated. More than 250 species of birds have shown to be susceptible to the infection, and it seems reasonable to conclude that most of the birds, if not all, are susceptible to the infection; infections in all the continents have been recognized, the clinical pictures that it induces vary considerably with the virulence of the strain, the affected species and the predilection of the virus to spread into the respiratory, digestive or nervous systems, within other factors. This document includes a vast and updated bibliographical revision that collects data including the history of the disease, its economic and public health importance, the aspects related to the agent, characteristic of the strains of high and low virulence, pathology and epidemiology, interpretation of serological tests, as well as the methods of diagnosis, prevention and control in birds of commercial flocks. In a separate chapter information on the disease in wild birds can be found, that includes the presentation of the clinical disease, diagnosis, prevention and control, stressing the main differences in relation with commercial birds, additionally, at the final part of the work, information compiled in Peru can be found, that includes not only detailed statistical data of the outbreaks and isolations involving the last 15 years, but also the main regulations imposed by the SENASA, vaccination programs recommended and the present situation of the disease in our country. The main objective of this bibliographical revision is to create a document that serves as basic consultation material that includes essential information for the understanding of the disease.

ÍNDICE

- I. Introducción
- II. Historia
 - 2.1. Definición y Sinónimos
 - 2.2. Importancia Económica
- III. Etiología
 - 3.1. Clasificación
 - 3.2. Morfología
 - 3.3. Composición Química
 - 3.4. Propiedades Biológicas
 - 3.4.1. Actividad Hemoaglutinante
 - 3.4.2. Actividad Neuraminidasa
 - 3.4.3. Fusión Celular y Hemólisis
 - 3.5. Replicación Viral
 - 3.6. Susceptibilidad a Agentes Físicos y Químicos
 - 3.7. Clasificación de las cepas
 - 3.7.1. Antigenicidad
 - 3.7.2. Pruebas de Patogenicidad
 - 3.7.3. Formación de Placa
 - 3.7.4. Elusión
 - 3.7.5. Termoestabilidad
 - 3.7.6. Polipéptidos Estructurales
 - 3.7.7. "Huellas Digitales" de los Oligonucleótidos
 - 3.7.8. Unión de Lectina
 - 3.7.9. Caracterización Genética
 - 3.8. Huéspedes de Laboratorio
 - 3.8.1. Animales
 - 3.8.2. Embrión de Pollo
 - 3.8.3. Cultivos Celulares
 - 3.9. Patogenicidad
 - 3.9.1. Bases Moleculares para la Patogenicidad
 - 3.10. Emergencia de Virus Virulentos
- IV. Patología y Epidemiología
 - 4.1. Incidencia y Distribución
 - 4.2. Huéspedes Naturales y Experimentales
 - 4.3. Transmisión y Diseminación
 - 4.4. Período de Incubación

- 4.5. Signos Clínicos
- 4.6. Patología
 - 4.6.1. Lesiones Macroscópicas
 - 4.6.2. Lesiones Microscópicas
 - a. Sistema nervioso
 - b. Sistema vascular
 - c. Sistema linfoide
 - d. Tracto intestinal
 - e. Tracto respiratorio
 - f. Sistema reproductivo
 - g. Otros órganos
- 4.7. Inmunidad
 - 4.7.1. Inmunidad Activa
 - a. Inmunidad Mediada por Células
 - b. Inmunidad Humoral
 - c. Inmunidad Local
 - 4.7.2. Inmunidad Pasiva
 - 4.7.3. Inmunosupresión
- 4.8. Importancia en Salud Pública
- V. Diagnóstico
 - 5.1. Aislamiento e Identificación del Agente Causal
 - 5.1.1. Detección Directa de los Antígenos Virales
 - 5.1.2. Aislamiento Viral del Virus de la Enfermedad de Newcastle
 - a. Sistemas de Cultivo
 - b. Muestras
 - c. Método de Aislamiento
 - 5.2. Caracterización Viral
 - a. Prueba de Patogenicidad in vivo
 - b. Pruebas de Patogenicidad in vitro
 - c. Perfil de las Propiedades Virales
 - d. Anticuerpos Monoclonales
 - 5.3. Serología
 - 5.3.1. Pruebas Serológicas para Anticuerpos de la Enfermedad de Newcastle
 - 5.4. Técnicas Moleculares en el Diagnóstico de la Enfermedad de Newcastle
 - 5.5. Diagnóstico Diferencial
- VI. Estrategias de Intervención
 - 6.1. Procedimientos de Manejo
 - 6.1.1 Políticas Internacionales de Control
 - 6.1.2. Políticas de Control Nacional

	6.1.3. Control y Prevención a Nivel de Granja
	6.1.4. Bioseguridad
	6.2. Vacunación
	6.2.1. Aspectos Históricos de la Vacunación
	6.2.2. Políticas de Vacunación
	6.2.3. Vacunas Vivas
	a. Cepas Virales
	b. Aplicación de Vacunas Vivas
	c. Ventajas y Desventajas de las Vacunas a Virus Vivo
	6.2.4. Vacunas Inactivadas
	a. Métodos de Producción
	b. Aplicación de Vacunas Inactivadas
	c. Ventajas y Desventajas de las Vacunas Inactivadas
	6.2.5. Programas de Vacunación
	6.2.6. Interpretación de la Respuesta Vacunal
	6.2.7. Vacunación de otras Aves de Corral
	6.2.8. Desarrollos a Futuro
	6.3. Tratamiento
VII.	La Enfermedad de Newcastle en Aves Silvestres
	7.1. Enfermedad Clínica y Patología
	7.2. Diagnóstico
	7.3. Tratamiento
	7.4. Control
	7.5. Cepa Variante de Paloma
VIII.	La Enfermedad de Newcastle en el Perú
IX.	Bibliografía
X.	Anexos

LISTA DE ABREVIATURAS

ENC:	Enfermedad de Newcastle.
vENC:	Virus de la enfermedad de Newcastle.
VVND:	Virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle
NVND:	Virus velogénico neurotrópico de la enfermedad de Newcastle
APMV-1:	Paramixovirus aviar tipo 1
PPMV:	Paramixovirus de paloma o cepa variante de paloma (Pigeon Paramyxovirus)
APMV:	Paramixovirus aviar
MDT:	Tiempo letal promedio del embrión (Mean Death Time)
ICPI:	Índice de patogenicidad intracerebral (Intra Cerebral Pathogenicity Index)
IVPI:	Índice de patogenicidad endovenosos (Intra Venous Pathogenicity Index)
CNS:	Enfermedad crónica del sistema nervioso central
OIE:	Oficina internacional de epizootias (Office International Des Épizooties)
ICTV:	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
FAO:	Food and Agriculture Organization of the United Nations
ARN:	Ácido ribonucleíco
cADN:	Clones de Ácido Desoxirribonucleico
MABs:	Anticuerpos monoclonales (Monoclonal Antibodies)
IFN:	Interferón
ELISA:	Ensayo inmunoabsorbente ligado a Enzima (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)
HA:	Hemoaglutinación
HI:	Inhibición de la hemoaglutinación.
VN:	Virus neutralización
IDD:	Inmunodifusión doble
PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa (Polimerase Chain Reaction)
RT-PCR:	Transcriptasa reversa PCR
RRT-PCR:	RT-PCR en tiempo real (Real-time RT-PCR)
REA:	Análisis de restricción de enzimas (Restriction Enzyme Analysis)
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida
DEAE:	Dietilaminoetil
HMA:	Mobilidad Heteroduplex
IBD:	Enfermedad de Gumboro
AIV:	Influenza aviar
IBV:	Bronquitis infecciosa
APV:	Pneumovirus aviar
Ig:	Inmunoglobulina

SPF:	Libre de patógenos específicos (Specific Pathogen Free)
EID ₅₀ :	Dosis infectiva promedio en huevo (Mean Egg infectious dose)
IM:	Intramuscular
HAU:	Unidades hemoaglutinantes
CV:	Coeficiente de Variación
CPE:	Efecto citopático
PGT:	Promedio geométrico de títulos.
BSL-3:	Nivel de bioseguridad 3 (Biosafety level 3)
bp:	pares de bases
nm:	nanómetros
μl:	microlitros
g/mL:	gramo/mililitro
mg/ml:	miligramo/mililitro
UI/ml.:	Unidades Internacionales/mililitro
p/v:	peso/volumen
rpm:	Revoluciones por minuto
°C:	Grados centígrados
pH:	Potencial Hidrógeno
FMV:	Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM:	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
SENASA:	Servicio Nacional de Sanidad Agraria
APA:	Asociación Peruana de Avicultores
D.S.:	Decreto Supremo
PBI:	Producto Bruto Interno
EEUU:	Estados Unidos de Norte América
EU:	Comunidad Europea
US\$:	Dólares Americanos

LISTA DE IMÁGENES

Imagen N° 1: Paramixovirus

Imagen N° 2: Paramixovirus

Imagen N° 3: Nucleocápside de Paramixovirus

Imagen N° 4: Apariencia en forma de espina de pescado de la nucleocápside

Imagen N° 5: Esquema de las proteínas del virus de la ENC

Imagen N° 6: Replicación viral

Imagen N° 7: Replicación viral

Imagen N° 8: Países que presentaron brotes de la ENC durante entre 1997 y 2000 ante la OIE

Imagen N° 9: Países que presentaron brotes de la ENC durante el año 2004 ante la OIE

Imagen N° 10: Signos Clínicos

Imagen N° 11: Lesiones Macroscópicas

Imagen N° 12: Lesiones Microscópicas

LISTA DE CUADROS

- Cuadro N° 1: Patotipos e índices de patogenicidad
- Cuadro N° 2: Determinación molecular de la virulencia basada en la secuencia de aminoácidos en el lugar de división de la proteína de Fusión (Proteína F)
- Cuadro N° 3: Secuencia de aminoácidos en el lugar de división F0
- Cuadro N° 4: Secuencia de nucleótidos/aminoácidos en el lugar de división de la proteína F de virus de alta y baja virulencia aislados en Australia en 1998
- Cuadro N° 5: Ejemplos de los índices de patogenicidad en distintas cepas del vENC
- Cuadro N° 6: Agrupamiento de aislamientos de vENC utilizando anticuerpos monoclonales de ratón y algunas características de los virus dentro de los grupos
- Cuadro N° 7: Interpretación de resultados según los títulos por la prueba HI según programa de vacunación
- Cuadro N° 8: Clasificación de patotipos según nueva definición de la OIE
- Cuadro N° 9: Ejemplos de vENC utilizados como vacunas
- Cuadro N° 10: Susceptibilidad de distintos órdenes de aves a la ENC
- Cuadro N° 11: Casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio De Patología Aviar – FMV-UNMSM (1990-2005)
- Cuadro N° 12: Casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio De Patología Aviar – FMV-UNMSM por tipo de producción (1990- Septiembre 2005)
- Cuadro N° 13: Casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio De Patología Aviar – FMV-UNMSM por estación (1990-2002)

Enfermedad de Newcastle

I. Introducción

La Enfermedad de Newcastle (ENC) es una enfermedad de importancia en pollos y otras especies aviarias a nivel mundial, la naturaleza y magnitud de la enfermedad varía entre países (King, 1999); sin embargo, continúa siendo una de las principales entidades patológicas que afecta a la industria avícola mundial y aunque aparenta estar controlada en la mayoría de países, frecuentemente se presentan brotes que causan serias pérdidas económicas (Villegas et al, 1995). La ENC pertenece a la lista única de la Office International des Epizooties (OIE) (anteriormente, junto con la Influenza Aviar, eran las únicas dos enfermedades aviarias pertenecientes a la Lista A) (OIE, 2005a) y es de notificación obligatoria a este organismo y en la mayoría de países, también es obligatoria la notificación a las autoridades sanitarias locales (Martins, 2003).

Más de 75 años de estudios sobre esta enfermedad han dado una perspectiva real sobre la emergencia y virulencia de los virus y el conocimiento sobre como controlar la enfermedad basándose en la bioseguridad en donde la introducción de la misma es poco probable y en la vacunación en donde la enfermedad es endémica, sin embargo, siguen ocurriendo brotes bastante diseminados en Europa (Gran Bretaña en 1997; Italia en 2000 y Dinamarca en 2002) y en muchos países en vías de desarrollo la enfermedad sigue siendo endémica y representa una barrera para el desarrollo de industrias avícolas comerciales y continua devastando las poblaciones de traspatio o de aldeas. Por el momento no existe ninguna razón para suponer que esta situación no vaya a persistir durante los próximos 75 años (Brown et al, 2003).

El virus de la Enfermedad de Newcastle (vENC) varía ampliamente tanto en el tipo como en la severidad de la enfermedad que produce, esta variación ha ocasionado algunos problemas en

reconocer y diagnosticar a la enfermedad cuando se introduce a algún país o área y como consecuencia con la nomenclatura (Alexander, 2003). El virus puede evolucionar con enorme variación en el curso del proceso, desde formas atípicas hasta clásicas, a lo largo de su recorrido epidemiológico (Comotto, 2000) y por lo mismo, es muy importante tener la capacidad de distinguir entre un virus de baja virulencia y las formas más virulentas del vENC (Seal et al, 2005).

La ENC es particularmente complicada debido a que distintos aislamientos y cepas virales pueden inducir grandes variaciones en la severidad de la enfermedad, incluso en un hospedero determinado, como el pollo (Alexander, 2003). Para simplificar el tema se han dividido las distintas formas clínicas en patotipos o formas, basándose en los signos clínicos en pollos (Alexander, 1998; Alexander, 2003; Carter, 2005; Jordan, 1990; Villegas et al, 1995; Comotto, 2000; Antillon, 2005):

- Forma Doyle: Infección aguda y letal de pollos a cualquier edad. Frecuentemente se observan lesiones hemorrágicas en el tracto digestivo. Esta forma de la enfermedad ha sido denominada Enfermedad de Newcastle Velogénica Viscerotrópica (VVND). Pertenecen a este tipo las cepas Milano y Herts '33.
- Forma Beach: Infección aguda, frecuentemente letal de pollos a cualquier edad, presentan signos respiratorios y neurológicos característicos y a eso se debe la actual denominación de Enfermedad de Newcastle Velogénica Neurotrópica (NVND). No se observan lesiones en el aparato digestivo. La cepa representativa es la Texas GB.
- Forma Beaudette: Parece ser una forma menos patogénica de NVND en donde la mortalidad solo ocurre en aves jóvenes. Los virus que causan este tipo son considerados mesogénicos y han sido utilizados como vacunas vivas secundarias. La cepa más conocida de este patotipo es la Roakin.
- Forma Hitchner: Se encuentra representada por una leve o inaparente infección respiratoria ocasionada por virus lentogénicos que son utilizados comúnmente como vacunas como las cepas Hitchner B1, La Sota y el Clon 30.
- Forma entérica asintomática o Lancaster: Es una infección principalmente intestinal con virus lentogénicos que no ocasionan ningún malestar evidente. Algunas vacunas comerciales son de este patotipo, por ejemplo las cepas Ulster 2C, V4 y VG/Georgia.

Sin embargo, dichos patotipos deben ser tomados sólo como una guía ya que siempre existe algún grado de sobreposicionamiento y algunos virus pueden no ser fácilmente ubicados en ningún patotipo específico (Carter et al, 2005; Jordan, 1990; Alexander, 1998).

II. Historia

Por lo general se considera que los primeros brotes de la ENC se dieron en 1926 en Java, Indonesia y en Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra. Existen reportes de brotes de enfermedades con cuadros compatibles con lo que hoy se conoce como ENC en Europa Central previos a 1926. Según algunos autores la enfermedad podría haber estado presente en Corea desde 1924. Otros consideran que la muerte de todos los pollos en las islas al este de Escocia en 1896 se le pueden atribuir al virus de la ENC (Alexander, 2003). Podrían haber existido brotes anteriores y haber sido atribuidos al virus de influenza altamente patógeno (Brown et al, 2003).

El vENC fue aislado por primera vez en 1926 y por 30 años permaneció como el único Paramixovirus aviar (APMV) reconocido (Alexander, 1989). Sin embargo, desde los primeros años de la década de los 70s se realizaron innumerables aislamientos de Paramixovirus serológicamente distintos al vENC a partir de especies aviares (Jordan, 1990).

El nombre "Enfermedad de Newcastle" fue creado como una medida temporal ya que se quería evitar utilizar un nombre descriptivo que pudiese ser confundido con otras enfermedades. No ha surgido un mejor nombre en los posteriores 75 años, aunque en los años recientes ha ganado popularidad un sinónimo para el virus, Paramixovirus Aviar tipo 1 (APMV-1) (Alexander, 2003).

Más tarde se volvió evidente que otras enfermedades menos severas eran ocasionadas por virus indistinguibles por métodos convencionales al virus de la ENC. En los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU), una enfermedad respiratoria leve, frecuentemente con signos nerviosos, fue descrita por primera vez en la década de los años 30s la cual fue llamada neumoencefalitis. Se demostró que era ocasionada por un virus indistinguible en pruebas serológicas al virus de la ENC. En los años siguientes se lograron numerosos aislamientos del vENC alrededor del mundo

que ocasionaban cuadros muy leves o que no presentaban signos clínicos en pollos (Alexander, 2003). Ahora se acepta que pools de dichos virus se encuentran perpetuados en aves acuáticas y otras aves silvestres (Alexander et al, 2004). La historia de la ENC en la mayoría de los países no se encuentra bien documentada (Alexander, 2003).

2.1. Definición y Sinónimos

La ENC también ha sido llamada pseudo peste aviar, pseudo plaga aviar, peste aviar, distemper aviar, plaga aviar Coreana, enfermedad de Tetelo y neumoencefalitis aviar (Alexander, 2003; Comotto, 2000) y es mundialmente conocida como la primera plaga de los pollos (Maho et al, 2000).

La nomenclatura puede también producir confusión ya que en algunos casos infecciones con cualquier cepa del virus de la Enfermedad de Newcastle (vENC) pueden ser denominadas como ENC, el término Enfermedad de Newcastle debería estar reservado para infecciones ocasionadas por aquellos virus que encajan dentro de la definición aceptada internacionalmente, la cual se refiere a infecciones ocasionadas por virus patogénicos (Alexander, 2003). La ENC velogénica viscerotrópica también es conocida con el nombre de Enfermedad de Newcastle exótica (APHIS, 2003). Aunque otros autores consideran el término de ENC exótica a la ocasionada por una cepa que no es endémica al país o zona en donde ha sido detectada (Wise et al, 2004).

Antes de 1999 la OIE definía a la ENC como la enfermedad producida por cepas del APMV-1 significativamente más virulentas que las cepas lentogénicas utilizadas en vacunación (B1 y La Sota) (Villegas, 2003; Hoerr, 2004). En la actualidad la ENC se define como:

“La infección de las aves ocasionada por un virus de los paramixovirus aviáres serotipo 1 (APMV-1) que reúne por lo menos uno de los siguientes criterios de virulencia:

- a. El virus tiene un Índice de Patogenicidad Intracraneal (ICPI) en pollos de un día de edad (*Gallus gallus*) de 0.7 o mayor.
- b. Se ha demostrado en el virus la presencia de múltiples aminoácidos básicos (directamente o por deducción) en el Terminal C de la proteína F2 y fenilalanina en el lugar 117, el cual es el Terminal N de la proteína F1. El término “múltiples aminoácidos básicos” se refiere al menos a tres residuos de argininas o lisinas entre las posiciones 113 y 116. La falla en la demostración del patrón característico de los residuos de aminoácidos tal como están descritos anteriormente, requerirá de la caracterización del virus aislado por una prueba de ICPI.

En esta definición, los residuos de aminoácidos están numerados a partir del Terminal N de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia de nucleótidos del gen F0. Las posiciones 113-116 corresponden a los residuos -4 a -1 del lugar de división” (OIE, 2000).

Vale la pena recalcar que paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1) y virus de la enfermedad de Newcastle (vENC) son sinónimos. El término variante de paloma (PPMV-1) ha sido utilizado para diferenciar a la variante antigénica responsable de la panzootia en palomas (Alexander, 1998);

la cual no es considerada actualmente como vENC clásico (Gerlach, 1994; King, 1999; Jordan, 1990).

2.2. Importancia Económica

El impacto económico global que tiene la ENC es enorme, ningún otro virus aviar lo logra superar y probablemente ocasione mayores pérdidas en la economía mundial que ningún otro virus animal. En los países desarrollados con industrias avícolas establecidas, no sólo se ocasionan pérdidas por brotes, sino que las medidas de control, incluyendo la vacunación, representan una pérdida continua para la industria. Incluso países libres de la enfermedad enfrentan gastos en análisis y pruebas para poder mantener el estatus necesario para la comercialización (Alexander, 2003).

En muchos países en desarrollo, la ENC es endémica, y por lo tanto, representa un importante factor limitante en el desarrollo de la producción avícola comercial y en el establecimiento de canales de comercialización por ser considerada una barrera sanitaria (SENASA Arg., 2000). La OIE ha establecido que la ENC representa la enfermedad de mayor riesgo para el intercambio comercial de aves y productos de origen animal (SENASA, 2001).

Un brote de la ENC causado por un virus velogénico viscerotrópico en una parvada de 48 aves de recreo en California, EEUU, en 1998, resultó en un embargo regional de los embarques de pollo a Rusia, Japón, Estonia, Marruecos, Nueva Zelanda y Rumania, hasta que el brote fue erradicado. Nunca se encontraron otras aves infectadas y el brote no estaba relacionado con explotaciones avícolas comerciales. El brote en pollos de abril de 1999 en Nuevo Gales, al sur de Australia, hizo que China prohibiera todas las importaciones provenientes de ese estado (King, 1999). Debido al brote ocurrido en México en el año 2000, se estimaron pérdidas económicas que sobrepasaron los US\$ 40'000,000. Las pérdidas incluyeron: aves sacrificadas (13'000,000 de pollos, 51,000 pollonas de reposición y 6'000,000 de embriones), mortalidad relacionada con la vacunación (5-6% a los 14 días y 15-20% total), granjas en cuarentena o desocupadas, inventario de alimento, ventas, costos logísticos (entierro, eliminación, camales cerrados por 4 semanas), etc. (Villegas, 2003). En el 2003, un brote de la ENC que comenzó en el sur de California llegó hasta Texas antes de que pudiera controlarse, un año más tarde, se estima un costo de más de US\$ 160'000,000 en pérdidas (WPT, 2004).

Muchos países dependen de las aves de traspatio o crianza en aldeas para aportar una importante ración de proteína de origen animal, ya sea en la forma de huevos o carne, sobretudo a mujeres y niños. Las pérdidas constantes a causa de la ENC afectan severamente la cantidad y calidad de los alimentos de personas con dietas marginales (Alexander, 2003). Según cálculos recientes, la avicultura de traspatio y al aire libre representa entre un 70-80 % del total de la producción de huevos y carne de aves en los países de bajos ingresos y con déficit de alimentos (FAO, 2003; Brown et al, 2003). Por lo tanto, el impacto económico de la ENC no debería ser medido exclusivamente en las pérdidas comerciales directas, ni en el incremento del porcentaje de mortalidad (Villegas et al, 1995), sino en algunos países deberían

tenerse en cuenta el efecto que tienen sobre la salud humana y la pérdida del potencial socioeconómico. (Alexander, 2003). Se estima que en países de Asia y África se tienen pérdidas del 60% de las aves de traspato, por ejemplo, en 1992 se estimó que cada año el 90% de las aves de traspato mueren en Nepal como resultado de la ENC (Brown et al, 2003) y se comprobó en Chad que la enfermedad es endémica, ocasionando tasas de mortalidad de entre 65 a 100%, contribuyendo así a empeorar la pobreza y desnutrición (Maho et al, 2000). El mayor impedimento para la producción de pollos en la mayoría de los países en desarrollo es la ENC (Young et al, 2000).

Cepas de baja virulencia pueden causar pérdidas económicas en ponedoras por baja en la producción de huevos y en pollos de carne por aerosaculitis. En un estudio reciente sobre la patogénesis de la ENC en pollos libres de patógenos específicos (SPF), infecciones con cepas lentogénicas no produjeron una sobre-infección; sin embargo, se encontró ARN viral en el miocardio y en los sacos aéreos. Infecciones con cepas lentogénicas pueden comprometer estos tejidos y producir infecciones secundarias y/o disminución en la productividad (King, 1999). Incluso infecciones inaparentes pueden resultar en pérdida de ganancia de peso en pollos de carne (Jordan, 1990).

Aunque se tomen acciones sanitarias inmediatas por medio de las autoridades, involucrando recursos técnicos y económicos, las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad son impredecibles (Martins, 2003).

III. Etiología

3.1. Clasificación

El orden *Mononegavirales* está conformado por cuatro familias: *Paramyxoviridae*, *Filoviridae*, *Bornaviridae* y *Rhabdoviridae* cuyas características son: virus de cadena simple, no segmentados, con ARN de sentido negativo y cápside de simetría helicoidal (Alexander, 2003; Jordan 1990; ICTV, 2005).

El virus de la ENC pertenece a la familia *Paramyxoviridae*. La taxonomía y nomenclatura de esta familia ha sido modificada recientemente por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) y se encuentra dividida en dos subfamilias (*Paramixovirinae* y *Pneumovirinae*) (Carter et al, 2005; ICTV, 2005):

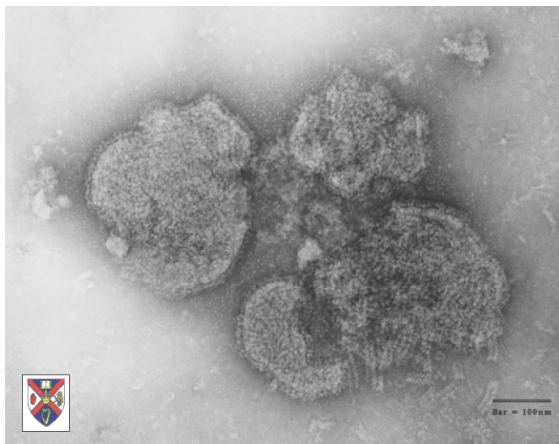
La subfamilia *Pneumovirinae* tiene dos géneros:

1. *Pneumovirus*, que contiene a los neumovirus de mamíferos.
2. *Metapneumovirus*, que contiene a los neumovirus aviares.

La subfamilia *Paramixovirinae* tiene cinco géneros (Carter et al, 2005; ICTV, 2005, OIE, 2004):

1. *Avulavirus*, que contiene al **vENC** y otros paramixovirus aviares.
2. *Rubulavirus*, que incluye el virus de las paperas, los parainfluenzas de mamíferos 2 y 4.
3. *Respirovirus*, que contiene a los parainfluenzas de mamíferos 1 y 3.
4. *Morbillivirus*, que incluye al Sarampión, Distemper y Rinderpest.
5. *Henipavirus*, que incluye al Hendravirus (antiguamente denominado morbilivirus equino) y al virus Nipah.

Imagen N° 1: Paramixovirus



Fuente: Mc Nulty, 1994 - © 1994 Veterinary Science Division

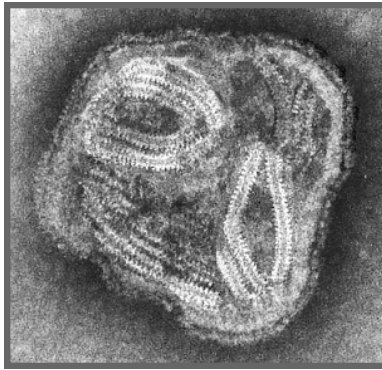
Pruebas de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), Inhibición de la Neuraminidasa, Neutralización del suero, Inmunodifusión doble (IDD) y otras pruebas serológicas además de la comparación de polipéptidos estructurales han resultado en la identificación de 9 serogrupos de los paramixovirus aviare: del APMV-1 al APMV-9 (Gerlach, 1994; Jordan 1990). De estos, el APMV-1 es, sin duda, el patógeno más importante para las aves (Alexander, 1989), pero los APMV-2, APMV-3, APMV-6 y APMV-7 también son conocidos por producir enfermedad en las aves. Los APMV-1 naturalmente infectan a un amplio rango de especies aviare, mientras que los otros paramixovirus aviare aparentemente se encuentran restringidos a un mismo grupo huésped. El término "paramixovirus aviar" fue conservado en vez de adoptar el nombre del género al que ahora pertenecen (Alexander, 1988); y se origina a partir de las palabras griegas "para" y "mixa" las cuales significan "al costado de" y "moco o mucosidad" (ICTV, 2005).

Los APMV-1 consisten en el vENC y cepas relacionadas que son serológicamente, molecularmente y patogénicamente únicas. Se requiere de anticuerpos monoclonales específicos o de análisis de secuencia de nucleótidos para diferenciar las infecciones ocasionadas por estas cepas de APMV-1 (Gerlach, 1994).

3.2. Morfología

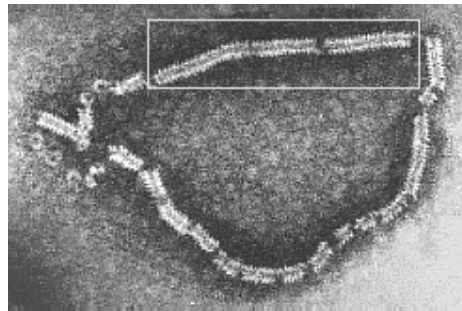
Las partículas virales del vENC son bastante pleomórficas, generalmente son redondeadas y miden entre 100-500 nm. de diámetro, aunque se pueden encontrar formas filamentosas de aproximadamente 100 nm. de ancho y de longitudes variables (Jordan, 1990). La superficie de la partícula viral se encuentra cubierta con proyecciones de dos tamaños distintos (Jordan, 1990). Al microscopio electrónico, se puede observar las nucleocápsides en forma de espina de pescado de aproximadamente 18 nm. de ancho y un grado de inclinación de 5 nm. (Jordan, 1990), las cuales muestran una simetría helicoidal, pudiendo ser observadas libres o emergiendo de una partícula viral (Alexander, 2003).

Imagen N° 2: Paramixovirus



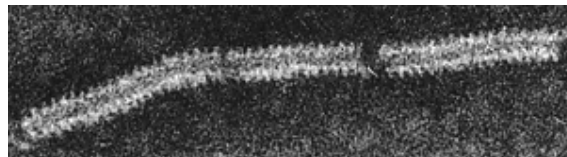
Fuente: Stannard, 1995 - © Linda Stannard 1995

Imagen N° 3: Nucleocápside de Paramixovirus



Fuente: Stannard, 1995 - © Linda Stannard 1995

Imagen N° 4: Apariencia en forma de espina de pescado de la nucleocápside



Fuente: Stannard, 1995 - © Linda Stannard 1995

3.3. Composición Química

Los paramixovirus característicamente consisten en una molécula simple de una cadena simple de ARN de aproximadamente 5×10^6 de peso molecular, lo que representa cerca del 0.5% del peso de la partícula viral (Alexander, 2003).

La longitud del genoma del vENC fue considerada de ser de 15,186 nucleótidos, sin embargo investigaciones más recientes concluyen que existen vENC de al menos dos longitudes genómicas distintas (15,186 y 15,192 nucleótidos). La inserción de 6 nucleótidos adicionales se encuentra localizada en la región no codificable del gen NP (Liu et al, 2005). (**Anexo 1**)

Las partículas virales tienen alrededor del 20-25% del peso de los lípidos y alrededor del 6% del peso de los carbohidratos derivados de la célula huésped. El peso molecular total de una partícula promedio es de unos 500×10^6 , con una densidad en sucrosa de 1.18 a 1.20 g/mL (Alexander, 2003).

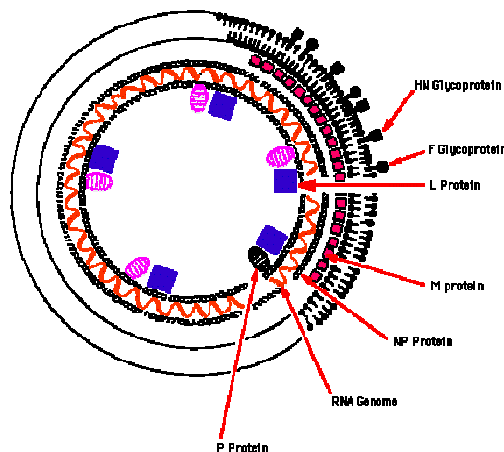
Por la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) las partículas del vENC purificadas por lo general revelan un mínimo de siete polipéptidos (Alexander *et al*, 1981), sin embargo, una de estas es la proteína huésped actina, la cual es incorporada a la partícula viral. El genoma del vENC codifica al menos a seis proteínas (Alexander, 2003; Czegledi *et al*, 2005):

1. Proteína L es la ARN-polimerasa dirigida por el ARN asociada con la nucleocápside;
2. Proteína HN es responsable de las actividades de la hemaglutinina y de la neuraminidasa y forma las proyecciones más largas (aproximadamente 8 nm.) (Jordan, 1990).
3. Proteína F o proteína de fusión forma las proyecciones más cortas en la superficie.
4. Proteína NP o de nucleocápside.
5. Proteína P o fosforilada, la cual esta asociada a la nucleocápside.
6. Proteína M o matriz.

El orden de los genes para estas proteínas en el genoma viral es 3'NP-P-M-F-HN-L5', al igual que en los otros paramixovirus (Alexander, 2003).

Se ha demostrado que el gen P del vENC produce 3 proteínas con secuencias idénticas en el terminal N, las proteínas P, V y W a frecuencias de 68%, 29% y 2% respectivamente (Park *et al*, 2003). Estas dos proteínas adicionales (V y W) se crean a partir del gen P gracias a mARNs alternativos que son generados por la edición de ARN. La inserción de un residuo G no templado da origen a un mARN codificador de proteína V, mientras que la inserción de dos residuos G no templados generan un mARN codificador de la proteína W. Poco se sabe hasta el momento sobre las funciones biológicas de estas dos proteínas (Huang *et al*, 2003).

Imagen N° 5: Esquema de las proteínas del virus de la ENC



Fuente: © Microbiology@Leicester2005

Se sabe que la proteína P es un componente esencial para la síntesis viral del ARN y que junto con la proteína L forman un complejo de transcripción activo (Huang et al, 2003; Mebatsion et al, 2001).

La proteína HN es multifuncional, es responsable de la unión a los receptores celulares, de promover la fusión a través de la interacción con la proteína F y del procesamiento de los viriones progenie al remover el ácido siálico de las nuevas proteínas sintetizadas en la cobertura (Connairs et al, 2002).

3.4. Propiedades Biológicas

Existen algunas propiedades que se encuentran asociadas con los paramixovirus, las cuales caracterizan al grupo (Alexander, 2003):

3.4.1 Actividad Hemoaglutinante

La habilidad del vENC y de otros paramixovirus aviares para aglutinar glóbulos rojos se debe a la unión de la proteína Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) con los receptores en la superficie de las células rojas. Esta propiedad y la inhibición específica de la aglutinación por medio de antisueros han demostrado ser armas poderosas en el diagnóstico de la enfermedad (Alexander, 2003).

Por lo general se utilizan glóbulos rojos de pollos para las pruebas de hemoaglutinación (HA) aunque el vENC aglutina también células de anfibios, reptiles y aves en general. Se demostró también que células rojas humanas, de ratones y de cuyes eran aglutinadas por el vENC, pero la habilidad para aglutinar las células de bovinos, caprinos, ovinos, porcinos y equinos dependía de la cepa del vENC (Alexander, 2003). Se ha observado que los glóbulos rojos de pavo trabajan mejor en la prueba de hemoaglutinación en aislamientos ocasionales, por ejemplo, en aquellos virus que han sido aislados de cormoranes (King, 2002).

Otros paramixovirus aviares también tienen la capacidad de aglutinar un amplio espectro de glóbulos rojos, pero esto dependerá tanto del serotipo como del virus aislado. Los paramixovirus pueden aglutinar otras células además de los glóbulos rojos si es que cuentan con los receptores adecuados (Alexander, 2003). Debe tenerse en cuenta siempre que no sólo los otros paramixovirus aviares pueden tener actividad hemoaglutinante, sino que los Orthomyxovirus, como el virus de la Influenza aviar también la tienen (Carter et al, 2005; Jordan, 1990; Swayne, 2003a).

3.4.2 Actividad de la Neuraminidasa

La enzima neuraminidasa es también parte de la molécula Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN). Una consecuencia obvia de la presencia de esta enzima es la elusión gradual de los glóbulos rojos aglutinados. La función exacta de la neuraminidasa en la replicación viral es desconocida, pero es probable que la

neuraminidasa remueve receptores virales de la célula huésped, previniendo la adhesión de las partículas virales liberadas y el agrupamiento viral (Alexander, 2003).

3.4.3 Fusión Celular y Hemólisis

Tanto el vENC como otros paramixovirus pueden producir la hemólisis de los glóbulos rojos o la fusión de otras células esencialmente por el mismo mecanismo. La adhesión a los receptores durante la replicación es seguida por la fusión de la membrana viral con la membrana celular, lo cual podría resultar en la fusión de una o más células (similar a la formación de sincitios que ocurre cuando las partículas virales salen por gemación de las células). La membrana rígida de los glóbulos rojos usualmente resulta en lisis al momento de la fusión de la membrana viral (Alexander, 2003).

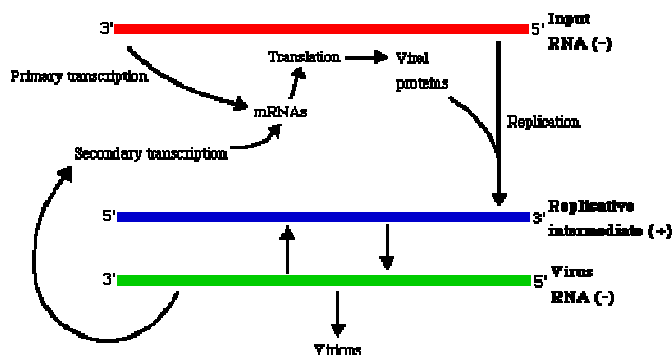
3.5. Replicación viral

La estrategia utilizada por el vENC para su replicación es la típica de los virus de sentido negativo, detallada en 1988 (Alexander, 2003).

El paso inicial es la adhesión del virus a los receptores celulares, la cual esta mediada por el polipéptido HN, luego se realiza la fusión de la membrana viral con la membrana celular por acción de la proteína de fusión (proteína F), de esta manera, el complejo nucleocápside ingresa a la célula y resulta en el efecto citopático característico de formación sincitial (Jordan, 1990).

La replicación intracelular se realiza por completo en el citoplasma. Debido a que el ARN viral tiene sentido negativo, la ARN-polimerasa dirigida por el ARN viral debe producir transcriptasas complementarias de sentido positivo para que puedan actuar como ARN mensajeros y así puedan utilizar el mecanismo celular, habilitando la traducción a proteínas y genomas virales. La proteína F es sintetizada como un precursor no funcional, F0, que requiere ser cortada en F1 y F2 por medio de proteasas de la célula huésped. Además la HN de algunas cepas del vENC podría requerir división post-traducción (Alexander, 2003).

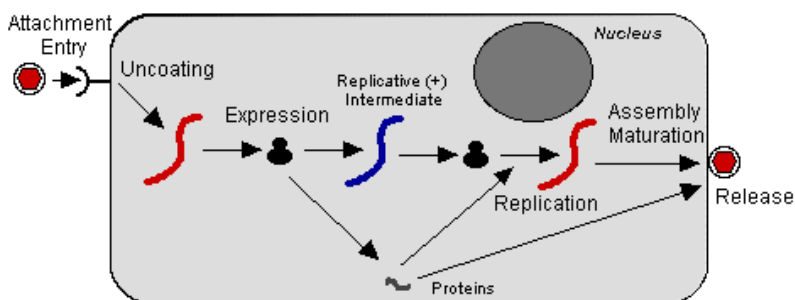
Imagen N° 6: Replicación viral



Fuente: © Microbiology@Leicester2005

Las proteínas virales sintetizadas dentro de la célula infectada son transportadas a la membrana celular. Sigue el alineamiento de la nucleocápside en las cercanías de las regiones modificadas de la pared celular, las partículas virales son eliminadas por gemación de la superficie celular (Alexander, 2003) y por lo tanto el envolvimiento del virus ocurre gracias a la membrana lipoproteica de la célula infectada (Jordan, 1990).

Imagen N° 7: Replicación viral



Fuente: © Microbiology@Leicester2005

3.6. Susceptibilidad a Agentes Físicos y Químicos

La infectividad del vENC y otros paramixovirus aviáres puede ser destruida por tratamientos químicos y físicos tales como calor (56°C por 3 horas o 60°C por 30 minutos), desecación, irradiación (incluyendo luz y rayos ultravioletas), procesos de oxidación, efectos del pH (acidez) y por varios compuestos químicos (como éter, solventes lipídicos y desinfectantes tales como formalina y fenol) (Carter et al, 2005; OIE, 2002). La tasa en la que disminuye la infectividad dependerá de la cepa viral, la naturaleza del medio en el que se encuentre suspendido, y la interacción entre tratamientos. Ningún tratamiento por si solo puede garantizar la destrucción de la totalidad de los virus, pero suele resultar en una baja tasa de sobrevivencia de virus infectivos (Alexander, 2003).

3.7. Clasificación de las Cepas

El término cepa por lo general se utiliza para referirse a un aislamiento bien caracterizado de un virus. El objetivo más importante en la caracterización de los virus es la agrupación de virus similares. Para el vENC, esto ha significado inevitablemente la distinción entre virus de alta y baja virulencia en pollos o, talvez más pertinentemente, entre virus enzoóticos y epizoóticos (Alexander, 2003).

Las pruebas de patogenicidad son marcadores útiles e importantes guías para los aislamientos. Cepas con la misma virulencia no indican enlaces epidemiológicos. Algunas propiedades biológicas virales no relacionadas han demostrado variar entre distintas cepas y

aislamientos, y estas propiedades han servido para caracterizar y agrupar las cepas aisladas (Alexander, 2003).

3.7.1 Antigenicidad:

Las técnicas de Virus Neutralización (VN) o difusión en agar gel han demostrado variaciones antigénicas menores entre diferentes cepas y aislamientos del vENC. Sin embargo, para objetivos prácticos, los aislamientos de vENC han sido considerados como un único grupo con antigenicidad homogénea (Alexander, 2003).

Por muchos años se considero que todas las cepas y aislamientos del vENC formaban un grupo serológicamente homogéneo y esto sirvió de base para los procedimientos de vacunación utilizados en la mayoría de países. Sin embargo, técnicas serológicas más exactas, recientemente desarrolladas y sobretodo el uso de anticuerpos monoclonales, han demostrado que existen variaciones antigénicas considerables entre diferentes cepas del vENC. Esta diferenciación ha sido de mucha ayuda en el entendimiento de la epidemiología de la ENC (Jordan, 1990).

La técnica de Anticuerpos Monoclonales (MABs) proporciona un nuevo acercamiento a la diferenciación antigénica de las cepas y aislamientos del vENC. Los MABs pueden detectar pequeñas variaciones en antigenicidad, tales como el cambio de un simple aminoácido en el epítipo hacia el cual el anticuerpo esta dirigido. Como resultado se puede diferenciar no sólo entre cepas, sino entre subpoblaciones virales. Algunos investigadores han utilizado MABs para diferenciar ente virus específicos, por ejemplo, diferenciando las cepas vacunales comunes, Hitchner B1 y La Sota y para diferenciar virus vacunales de virus de áreas epizooticas (Alexander, 2003).

La tipificación por MABs también fue utilizada para establecer que fue sólo una variante del vENC la responsable de la panzootia en palomas y se pudo confirmar su presencia en muchos países. Durante la epizootia de ENC en Gran Bretaña en 1984, la rápida detección del PPMV permitió un seguimiento temprano de la fuente de infección hacia la contaminación del alimento, pudiéndose así, controlar la enfermedad (Alexander, 2003).

3.7.2. Pruebas de Patogenicidad:

La caracterización de la virulencia de las cepas del vENC requiere de evaluaciones de laboratorio debido a que el estado inmunológico y la susceptibilidad de los diferentes huéspedes pueden modificar la figura clínica con respecto a aquella observada en pollos susceptibles inoculados. El desarrollo de pruebas estandarizadas ha sido crítico para averiguar la patogenicidad (King, 1999).

El primer intento en distinguir o agrupar cepas virales en el laboratorio fue por la determinación del grado de patogenicidad. Algunos investigadores sugirieron que las cepas del vENC podrían ser convenientemente agrupadas según el tiempo letal

promedio para el embrión (MDT) transcurrido post-inoculación en huevos de pollo que puede variar entre menos de 50 horas hasta más de 100 horas (Carter et al, 2005; Alexander, 2003)

Otras pruebas diseñadas para diferenciar cepas usan la evaluación directa de signos clínicos o las muertes inducidas en aves infectadas. Estas evaluaciones permiten la cuantificación en base a la designación de puntaje de acuerdo al grado de severidad y el cálculo de un índice de patogenicidad. Las pruebas mayormente utilizadas son el Índice de Patogenicidad Intracerebral (ICPI) en pollos de un día de edad y el Índice de Patogenicidad Endovenosa (IVPI) en pollos de 6 semanas de edad. En los EEUU, se hace una distinción importante entre el virus velogénico viscerotrópico y otras cepas y virulencias para lo cual se utiliza la prueba de Patogenicidad por Inoculación Intracloacal (Alexander, 2003).

Los valores obtenidos proveyeron una guía sobre la enfermedad producida en pollos infectados. Estos términos terminaron siendo aplicados como: virulencia alta, virulencia moderada y virulencia baja, independientemente del método de evaluación (Alexander, 2003).

El promedio de MDT e ICPI fue inicialmente utilizado como método práctico para la tipificación y diferenciación de cepas vacunales lentogénicas y mesogénicas del vENC (King, 1999).

Cuadro N° 1: Patotipos e índices de patogenicidad

Patotipo	Rango de los índices			Ejemplos de cepas virales
	MDT	ICPI	IVPI	
Velogénico Viscerotrópico	< 60	1.5 – 2.0	2.0 – 3.0	Herts '33, N.Y. Parrot 70181, CA2089/72
Velogénico Neurotrópico	<60	1.5 – 2.0	2.0 – 3.0	Texas GB
Mesogénico	60 – 90	1.0 – 1.5	0.0 – 0.5	Roakin, Komarov, Mukteswar, H
Lentogénico	> 90	0.2 – 0.5	0.0	Hitchner B1, La Sota, Clon 30
Entérico Asintomático	> 90	0.0 – 0.2	0.0	Ulster 2C, V4, MC110

MDT: Tiempo letal promedio en embriones expresado en horas; ICPI: Índice de patogenicidad intracerebral en pollos de 1 día de edad; IVPI: Índice de patogenicidad endovenosa en pollos de 6 semanas de edad.

Fuente: Alexander, 1998

3.7.3. Formación de Placa:

La habilidad para formar placas, el tamaño y la morfología de las mismas han sido utilizadas para caracterizar a los virus. Los vENC de baja virulencia no forman placas en cultivos celulares sin la adición de iones de Magnesio (Mg^{2+}) y dietilaminoetil (DEAE) o tripsina al medio de cultivo. Las placas pueden presentarse de dos distintas formas: claras o rojas y el tamaño parece tener relación con la virulencia del virus en pollos (Alexander, 2003).

3.7.4. Elusión:

La tasa de elusión de los glóbulos rojos de pollo aglutinados por el virus ha sido utilizada como un método para agrupar ampliamente a los aislamientos del vENC como elutores rápidos o lentos (Alexander, 2003).

3.7.5. Termoestabilidad:

La termoestabilidad de la actividad de la HA en aislamientos del vENC es variable y ha sido utilizada como una prueba de caracterización. Esta propiedad ha demostrado ser un arma poderosa en estudios epidemiológicos y un método rápido para distinguir entre algunas cepas virulentas y otras avirulentas (Alexander, 2003).

3.7.6. Polipéptidos Estructurales:

Se han reportado variaciones y similitudes en los polipéptidos estructurales entre distintas cepas del vENC. El análisis de los polipéptidos estructurales por medio de PAGE, después de un tratamiento enzimático, ha sido también de utilidad para demostrar relaciones cercanas entre virus que fueron aislados en un mismo brote epidemiológico y que son diferentes a otras cepas (Alexander, 2003).

3.7.7. "Huellas Digitales" de los Oligonucleótidos:

Las "huellas digitales" de los oligonucleótidos del ARN genómico se pueden utilizar para comparar diferentes cepas y aislamientos del vENC. Este acercamiento demuestra la identidad de los virus de la misma fuente y los diferencia de otros aislamientos, pero no se podría utilizar como un método rutinario de diagnóstico (Alexander, 2003).

3.7.8. Unión de Lectina:

Se ha demostrado que distintas cepas del vENC muestran variaciones en el perfil de la unión de la lectina, lo cual podría ser útil para la diferenciación y agrupación (Alexander, 2003).

3.7.9. Caracterización Genética:

La mejora en la tecnología para la secuenciación de nucleótidos, la disponibilidad de información de la secuenciación de mayor cantidad de vENC en bases de datos (GenBank) (Kianizadeh et al, 2005), y la demostración que incluso pequeñas fracciones de secuenciación pueden dar resultados importantes en el análisis filogenético, han llevado a un incremento notable en estudios en los últimos años. Se ha prestado particular importancia al gen de la fusión ya que este lleva a predicciones de virulencia. Se ha detectado una diversidad genética considerable, pero virus que comparten temporalmente geografía, antigenicidad o parámetros epidemiológicos tienden a caer

en linajes específicos, y esto ha probado ser de valor en asesorar tanto a la epidemiología global como a la diseminación local de la ENC (Alexander, 2003).

Aunque en el pasado los estudios filogenéticos no pudieron ser utilizados como herramientas de rutina, la mayor disponibilidad y el incremento en la velocidad de producción de resultados utilizando kits RT-PCR (Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa) disponibles comercialmente y el uso de secuenciadores automáticos, significa ahora que dichos estudios se encuentran dentro de las capacidades de mucho más laboratorios de diagnóstico y pueden proveer de resultados significativos de forma contemporánea más que en retrospectiva (OIE, 2004).

Todos los nuevos aislamientos en el mundo son similares al grupo filogenético que incluye cepas de baja virulencia como las cepas Ulster y V4, tanto las cepas aisladas de cormoranes y pavos en 1992, como las cepas velogénicas viscerotrópicas aisladas de aves de compañía identificadas durante las décadas de los 70s y los 90s. El linaje que incluye las vacunas B1 y La Sota, el mesogénico Roakin y el velogénico neurotrópico Texas GB no se han diseminado más y no existen nuevos aislamientos similares a este grupo filogenético. El reciente aislamiento de virus parecidos a B1 y La Sota ha ocurrido en parvadas donde estas cepas eran utilizadas en las vacunas o en aves provenientes de granjas donde existía la historia de que anteriormente se había vacunado (King, 1999).

Una observación interesante es que virus con características genéticas especiales no necesariamente desaparecen cuando otras variantes aparecen y pueden seguir siendo aisladas muchos años después de su primer aislamiento (Alexander, 2003).

El análisis filogenético de los vENC es un arma poderosa para la investigación de relaciones epidemiológicas entre los distintos aislamientos de vENC presentes en distintas partes del mundo (Mase et al, 2002). Basándose en el mapeo de sitios de restricción y el análisis de secuencias del gen de la proteína F se ha demostrado que el vENC ha evolucionado en diferentes linajes genéticos los cuales se encuentran correlacionados en cierto grado con la virulencia y las especies huéspedes así como al lugar y al tiempo en el que se logró el aislamiento de las cepas (Czegledi et al, 2005). Se han revelado dos grandes grupos, los cuales pueden ser divididos en tres linajes (Mase et al, 2002) y clasificados en nueve genotipos (Liu et al, 2005). El genotipo I probablemente represente la forma primordial del vENC y contiene virus avirulentos principalmente de aves acuáticas aunque también de pollos. Tres genotipos distintos, II, III y IV, se encontraron envueltos en la primera panzootia. Dos nuevos genotipos, V y VI, emergieron durante la segunda pandemia. El subtipo VIb originario de palomas fue el responsable de la tercera pandemia que afectó básicamente a estas aves. Dos genotipos nuevos, VII y VIII aparecieron a finales de las décadas de los 80s y 90s en el este de Asia, Europa y Sudáfrica. Los virus del genotipo IX han sido reportados sólo en China y han ocasionado enfermedad en pollos en algunas áreas. La evidencia también

demuestra que el genotipo IX se encuentra más relacionado con los genotipos reconocidos más tempranamente II, III y IV que con los genotipos V y VI o el más recientemente reconocido genotipo VII (Liu et al, 2005).

Como ya se mencionó anteriormente existe una inserción de 6 nucleótidos adicionales en algunas cepas del vENC. Virus dentro de los genotipos V, VI, VII, VIII y IX tienen ésta inserción, mientras que virus dentro los genotipos I, II, III y IV no la tienen; aunque aún no se conoce si todos los virus incluidos dentro los genotipos del I al IV tienen un genoma de 15,186 nucleótidos y que todos los virus incluidos dentro de los genotipos del V al IX tienen genomas de 15,196 nucleótidos, existe una posible correlación entre ésta inserción y sus fenotipos biológicos; además, la inserción podría tener un impacto significativo en la evolución del vENC (Liu et al, 2005). Basándose en esta característica se considera que existen dos linajes genéticos principales, uno que contiene a los genotipos tempranos (I al IV) y el otro a los genotipos más recientes (V al IX), donde todos los más recientes tendrían un origen común. El análisis filogenético además ha revelado la división de los genotipos según estos dos linajes principales y el origen múltiple de las cepas virulentas. La estructura espacial y temporal de los linajes genéticos del vENC apoya una filodinamia característica de los paramixovirus: una selección inmune débil con una aparición rápida y/o paralela de diversas variantes (Czegledi et al, 2005).

3.8. Huéspedes de Laboratorio

3.8.1. Animales

El vENC puede infectar y multiplicarse tanto en una serie de especies no aviares como en especies aviares después de una infección en laboratorio. Sin embargo, el pollo sigue siendo la especie de mayor disponibilidad y mayor utilización en el laboratorio, además de ser el huésped natural de mayor importancia de la enfermedad (Alexander, 2003).

3.8.2. Embrión de pollo

Todos los paramixovirus aviares replican en huevos embrionados de pollo (Carter et al, 2005). Por su disponibilidad (especialmente los huevos SPF), sensibilidad para el crecimiento viral, y la alta titulación que suele resultar por el crecimiento viral, son generalmente utilizados para el aislamiento y la propagación del virus (Alexander, 2003).

Las cepas y aislamientos del vENC varían en la capacidad y el tiempo que les toma matar al embrión de pollo. Los títulos también se ven influenciados por la cepa, donde se obtienen mayores títulos con aquellas cepas que causan una muerte lenta o no producen mortalidad. Con algunas cepas se puede observar una interferencia en

crecimiento viral y la mortalidad embrionaria por la presencia de anticuerpos maternos en la yema (Alexander, 2003).

La vía de inoculación es también importante. La inoculación a través del saco vitelino, en comparación con la cavidad alantoidea, produce una mortalidad embrionaria mucho más rápida y ocasiona mortalidad con cepas que no ocasionan muerte consistentemente por otras vías de inoculación (Alexander, 2003).

3.8.3. Cultivos Celulares

Las cepas del vENC pueden replicar en un amplio rango de células. En 1966 se listaron 18 tipos de células primarias y 11 líneas celulares como susceptibles. Muchas otras han sido añadidas a la lista desde este reporte. Los efectos citopáticos (CPE) son usualmente la formación de sincitio con la consiguiente muerte celular, existiendo alguna relación entre el CPE y la virulencia del virus en pollos. La formación de placas en células embrionarias de pollo se restringe para los virus velogénicos y mesogénicos a menos que se añadan iones de Mg^{+2} y DEAE (Alexander, 2003) o tripsina (0.005-0.01 mg/ml.) (Alexander, 1998).

Debido al relativo pobre crecimiento de los vENC en la mayoría de los cultivos celulares, éstos son imprácticos para la propagación viral en la mayor parte de los casos (Alexander, 2003).

3.9. Patogenicidad

La virulencia de las cepas del vENC varía considerablemente según el huésped y aparentemente es dependiente de los epítomos y el estatus enzimático del huésped (Gerlach, 1994). Los pollos son altamente susceptibles, mientras que los patos y gansos pueden encontrarse infectados y mostrar signos clínicos leves o ninguno, incluso con cepas letales para pollos (Alexander, 2003; Alexander, 1998). Mediante la inoculación de cepas altamente virulentas del vENC se demostró que la susceptibilidad varía entre pollos, pavos SPF, pavos comerciales y palomas (Wakamatsu et al, 2004)

El virus inicialmente se replica en el epitelio de la mucosa de los tractos respiratorio y digestivo, se difunde vía hemática al bazo y médula ósea produciéndose la viremia secundaria, llegando a otros órganos blanco (Fenner, 1992). La afinidad del vENC por los eritrocitos le permite la distribución a través de todo el cuerpo del huésped (Gerlach, 1994). En pollos, la patogenicidad de la ENC es determinada principalmente por la cepa viral, aunque la dosis, vía de administración, edad de las aves y condiciones ambientales tienen también algún efecto. En general, aves de menor edad presentan cuadros más agudos. En campo, aves jóvenes con virus virulentos pueden manifestar muertes súbitas sin mayores signos clínicos, sin embargo, en aves de mayor edad la enfermedad puede ser más prolongada y con signos clínicos característicos. La raza o línea de las aves no parece tener un efecto significativo en la susceptibilidad de los pollos a la enfermedad. Las vías naturales de infección (nasal, oral y ocular) parecen enfatizar

la naturaleza respiratoria de la enfermedad, mientras que las vías intramuscular (IM), endovenosa e intracerebral parecen enfatizar los signos neurológicos (Alexander, 2003).

Aunque el sobrecalentamiento de las aves podría ser un factor desencadenante (Gerlach, 1994) y, se ha demostrado mayor sobrevivencia del vENC en la temporada seca en comparación con la temporada de lluvias (Onapa et al, 2005); no se ha descrito ningún pico estacional verdadero (Gerlach, 1994; Onapa et al, 2005).

Se ha demostrado que la adherencia de *E. coli* a células de riñón de embrión de pollo se incrementa significativamente cuando estas células han sido infectadas previamente con el vENC (Eltayeb et al, 2005).

3.9.1. Bases Moleculares para la Patogenicidad

Los determinantes de virulencia del vENC no están todavía comprendidos del todo. Se ha postulado que la secuencia de aminoácidos en el lugar de división de la proteína F es el mayor determinante de la virulencia del virus (Peeters et al, 1999; Weingartl et al, 2003). Sin embargo, el rol de otras proteínas virales en la patogenicidad del vENC aún permanece desconocido (Huang et al, 2003) y se asume que además del lugar de división de la proteína F, la secuencia de nucleótidos adicionales en el genoma del ARN del vENC podría contribuir a la virulencia (Peeters et al, 1999).

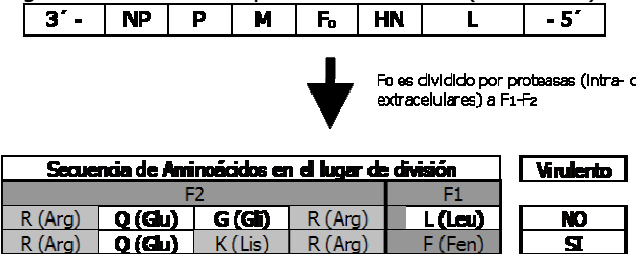
Durante la replicación del vENC, la proteína de fusión es producida como una glicoproteína precursora, F0, la cual tiene que dividirse en F1 y F2 para que las partículas virales progenie puedan ser infectivas. Esta división post-traducción es mediada por las proteasas de la célula huésped. Si la división fallara, se producirían partículas virales no infectivas. La tripsina puede dividir los F0 de todas las cepas del vENC, y en tratamientos in vitro, se ha logrado recuperar la infectividad de cepas no infectivas (Alexander, 2003).

La importancia de la división de F0 fue demostrada fácilmente, ya que los virus que normalmente eran incapaces de replicarse o de producir placas en cultivos celulares, lo pudieron hacer una vez que se les adicionó tripsina al medio de cultivo. Aunque todos los virus pueden replicarse y producir progenie infectiva en la cavidad alantoidea, los virus patogénicos para pollos pueden replicar en una amplia variedad de tipos celulares in vitro con o sin la adición de tripsina, mientras que cepas de baja virulencia sólo pueden replicarse cuando se les adiciona tripsina. Así, la molécula F0 de los virus virulentos puede ser dividida por proteasas del huésped o por proteasas encontradas en una amplia variedad de células y tejidos, mientras que la sensibilidad de la molécula F0 en virus de baja virulencia se encuentra restringida para ser dividida por enzimas específicas del huésped. Consecuentemente estos virus pueden crecer sólo en algunos tipos de células huésped (Alexander, 2003, Brown et al, 2003).

Reportes tempranos donde se deduce la secuencia de aminoácidos del precursor F0, a partir de la secuenciación de nucleótidos del gen F de un número de cepas del vENC, permitieron la comparación de los virus lentogénicos con los mesogénicos o velogénicos. Para todos los virus el aminoácido en la posición 116, en el terminal C de la proteína F2 en el lugar de división, fue

la arginina. Todos los virus de baja virulencia tenían leucina en la posición 117, en el terminal N de la proteína F1, y otros aminoácidos básicos en el residual 113. En contraste, todos los virus mesogénicos y velogénicos tenían fenilalanina en el residual 117, y con una excepción, aminoácidos básicos en los residuales 115 y 112 además de los del 113 y 116. La excepción fue el virus variante de palomas PPMV-1, que si bien es idéntico a los virus virulentos no posee un aminoácido básico en la posición 112. Estudios posteriores indicaron que esta variación es usual para el virus variante de paloma PPMV-1 pero no tiene importancia en la variabilidad de la patogenicidad registrada en pollos (Alexander, 2003). De este modo, parece ser que se requiere de al menos un par de aminoácidos básicos en los residuales 115 y 116 además de fenilalanina en el residual 117 y un aminoácido básico (arginina) en el 113 para que el virus muestre patogenicidad en pollos (OIE, 2004).

Cuadro N° 2: Determinación molecular de la virulencia basada en la secuencia de aminoácidos en el lugar de división de la proteína de Fusión (Proteína F)



Fuente: Hoerr, 2004

Entonces, parecería que el mecanismo controlador de la patogenicidad el vENC es muy similar al descrito para los virus de Influenza. La presencia de aminoácidos básicos adicionales en cepas virulentas significa que la división puede ser producida por proteasas presentes en un amplio rango de células en distintos tejidos y órganos huésped. La enzima ubicua aún no ha sido identificada por completo, pero como sucede con los virus de la influenza aviar, es muy probable que sea una o más pro-proteína(s) del procesamiento de una proteasa, relacionada a la subilisina, en donde la furina es la candidata principal. Para los virus lentogénicos, la división sólo se da a cabo cuando las proteasas reconocen una determinada arginina, es por esto que sólo replican en células donde están presentes enzimas tipo tripsina como en el epitelio respiratorio y digestivo, mientras que los virus virulentos pueden replicar en células ubicadas en un amplio rango de tejidos y órganos, resultando en una infección sistémica fatal (Alexander, 2003).

Se ha reportado evidencia experimental de que cambios en el lugar de división F0 pueden cambiar la virulencia de un aislamiento, por ejemplo, al cambiar la secuencia de aminoácidos en el lugar de división F0 de la cepa La Sota a la secuencia típica de las cepas virulentas, el ICPI incrementó de 0.00 a 1.28 (King, 1999). Se ha comprobado que ocurre la reversión a virulencia a partir de poblaciones de cepas no virulentas y que la virulencia puede incrementarse después

de un pasaje en cerebro de pollo debido a alteraciones en la secuencia de aminoácidos en el lugar de división de la proteína F (De Leeuw et al, 2003).

Cuadro N° 3: Secuencia de aminoácidos en el lugar de división F0

Cepa viral	Virulencia en pollo	Aminoácidos en el lugar de división (111-117)
Herts 33	Alta	-G- R-R-Q-R-R *F-
Essex '70	Alta	-G- R-R-Q-K-R *F-
135/93	Alta	-V- R-R-K-K-R *F-
617/83	Alta	-G-G- R-Q-K-R *F-
34/90	Alta	-G- K-R-Q-K-R *F-
Beaudette C	Alta	-G- R-R-Q-K-R *F-
La Sota	Baja	-G-G- R-Q-G-R *L-
D26	Baja	-G-G- K-Q-G-R *L-
MC110	Baja	-G-E- R-Q-E-R *L-
1154/98	Baja	-G- R-R-Q-G-R *L-
Aislados Australianos		
Peats Ridge	Baja	-G- R-R-Q-G-R *L-
NSW 12/86	Baja	-G- K-R-Q-G-R *L-
Dean Park	Alta	-G- R-R-Q-R-R *F-
Somersby 98	Baja	-G- R-R-Q-R-R *L-
PR-32	?	-G- R-R-Q-G-R *F-
MP-2000	Baja	-G- R-R-Q-K-R *L-

* Representa el lugar de división. Los aminoácidos básicos se muestran en negrita; nótese que todos los virus virulentos tienen fenilalanina (F) en la posición 117, el terminal N de la proteína F1
G: glicina; R: arginina; Q: glutamina; F: fenilalanina; K: lisina; V: valina; L: leucina; E: ácido glutámico.

Fuente: Alexander, 2003

Mientras aumenta la información disponible sobre la secuenciación, se hace más aparente que existen variaciones en el lugar de división F0 (Alexander, 2003). La mayoría de los virus patogénicos para pollos muestran la secuencia $^{112}\text{R/K-R-Q-K/R-R-F}^{117}$, los de baja virulencia muestran la $^{112}\text{G/E-K/R-Q-G/E-R-L}^{117}$ y las cepas variante de paloma muestran la $^{112}\text{G-R-Q-K-R-F}^{117}$ (OIE, 2004). Durante las investigaciones y vigilancia epidemiológica que se realizaron después del brote de ENC en Australia entre 1998-2000, se aislaron muchos virus que mostraban variaciones en los aminoácidos en el lugar de división F0. Las variaciones en estos virus producidos naturalmente confirman que el mínimo requerimiento para que los vENC muestren alta virulencia en pollos parece ser el motif $^{-113}\text{R-Q-R/K-R*F}^{-117}$ y que la secuencia de aminoácidos de todos los virus de baja virulencia aislados hasta el momento es $^{-113}\text{K/R-Q-G/E-R*L}^{-117}$ (Brown et al, 2003). La razón del requerimiento absoluto de fenilalanina en la posición 117 todavía no esta clara y puede no ser parte del reconocimiento del motif de la proteasa ubicua. Aún quedan muchas preguntas sin resolver sobre el motif mínimo preciso para determinar la virulencia, pero parece probable que esto se evalúe en los próximos años utilizando clones de ADN (cADN) del vENC y técnicas de reversión genética (Alexander, 2003).

Aunque existe menos información que para la proteína F, se ha determinado la secuencia de la HN de varias cepas. Parecería que algunas cepas producen un precursor denominado HN₀ como por ejemplo la Ulster 2C y la D26, mientras que otras no, como la lentogénica Hitchner

B1, la mesogénica Beaudette C, dos cepas velogénicas (la Australiana de Victoria y la Italiana) y la variante de palomas; las cuales, tienen codones terminales ubicados antes del final del gen HN, lo cual no permite la producción de la proteína HN₀, y por lo tanto no requieren de una división post-traducción. En algunas circunstancias esto ha sido utilizado para diferenciar entre virus endémicos de baja virulencia y otros virus (Alexander, 2003).

La secuencia de aminoácidos de la proteína viral HN también parece gobernar la virulencia de las cepas del vENC (Gerlach, 1994). La proteína HN del vENC juega un rol crucial en el proceso de infección, sin embargo la exacta contribución del gen HN a la patogénesis del virus no es conocida. Resultados de estudios indican que la virulencia es una función de la diferencia de aminoácidos en la proteína HN, esto es consistente con la hipótesis que la virulencia de los vENC es multigénica y que el lugar de división de la proteína F por si sola no determina la virulencia de una cepa (Huang et al, 2004). Se ha reportado que el cambio de un solo aminoácido en la secuencia de la proteína F altera el requerimiento de la proteína HN para la expresión de la formación de sincitios (Sergel et al, 2000). La comparación de cepas del vENC que poseen exactamente el mismo lugar de división de la proteína F y que presentan diferencias significativas en la virulencia implican también que existen factores adicionales que afectan la patogenicidad y se concluye que tanto la región del tallo como la cabeza globular de la proteína HN estarían relacionadas en la determinación de la virulencia (De Leeuw et al, 2005). La presencia de F y/o HN de virus virulentos insertadas en cepas lentogénicas ocasionan la diseminación del virus de manera similar a como lo harían las cepas virulentas de campo (Oldoni et al, 2005).

Se ha demostrado que la evaluación de la virulencia de los APMV-1 por la secuencia de aminoácidos característica en el lugar de división de la proteína F y el lugar del codon de terminación del terminal C de la proteína HN se correlaciona al de la patogenicidad en campo para todas las cepas evaluadas. Por lo tanto, la evaluación de la patogenicidad de los APMV-1 in vivo podría ser sustituida por la identificación de las características de los genes F y HN in vitro (Wei et al, 2005).

La mutación del gen P en la cepa Beaudette C ha logrado disminuir la virulencia en pruebas preliminares (King et al, 2003). Adicionalmente se ha demostrado que la modificación de este gen en una cepa virulenta ocasiona una disminución en la severidad de las lesiones histológicas y la distribución viral (Wakamatsu et al, 2004). Así mismo, el rompimiento del gen P disminuyó la diseminación de cepas velogénicas, por lo que se concluye que el gen P también contribuye a la patogenicidad (Oldoni et al, 2005).

Se conoce poco sobre el rol de las proteínas V y W en la replicación y patogénesis del vENC. La proteína V posee un dominio del terminal carboxilo que es rico en cisteína y se une al Zinc, además se encuentra incorporada a los viriones. Se ha demostrado, mediante técnicas de reversión genética, que la ausencia de esta proteína retarda el crecimiento de virus recombinantes en cultivos celulares. Recientemente se ha demostrado que la proteína V es una antagonista del interferón (IFN), sin embargo, el mecanismo molecular del antagonismo al IFN

y el rol específico de la proteína en la patogenicidad no han sido aún investigados (Huang et al, 2003), aunque se ha indicado que el dominio del terminal carboxilo de la proteína V juega un rol crítico en la replicación viral (Park et al, 2003). Estudios de patogenicidad han demostrado que la proteína V del vENC contribuye significativamente a la virulencia de este. Se ha demostrado claramente que la proteína V es capaz de mediar el escape viral de los mecanismos celulares inducidos por IFN mediante la degradación de la proteína STAT 1, esta degradación puede bloquear la señalización de ambos IFN α/β y IFN λ (Huang et al, 2003). También se ha probado que la proteína V juega un papel importante en la restricción entre distintos huéspedes, ya que la función antagonista es especie específica. Además dicha proteína juega un rol importante en prevenir la apoptosis de manera especie específica, esta información sugiere que el rango de huéspedes para el vENC se encuentra limitado por la habilidad de su proteína V para prevenir eficientemente las defensas innatas del huésped, tales como la respuesta del IFN y la apoptosis (Park et al, 2003). Se sugiere que la proteína W probablemente juegue un papel mínimo, o nulo en la patogenicidad del virus, sin embargo es necesario realizar estudios adicionales (Huang et al, 2003).

La habilidad para ajustar la virulencia del vENC tendrá importantes aplicaciones para el desarrollo racional de vacunas vivas para la ENC que sean óptimas tanto en su atenuación como en su inmunogenicidad (Huang et al, 2003).

3.10. Emergencia de Virus Virulentos

La emergencia de la ENC como una enfermedad altamente patógena a partir de 1926 sugiere que algunos cambios mayores han ocurrido en el virus o en los huéspedes (Alexander et al, 2004). El mayor entendimiento de las bases moleculares para la virulencia ha dado un acercamiento hacia como los virus que ocasionan la ENC pueden emerger. Se han presentado tres posibles causas para explicar la emergencia repentina de los vENC virulentos (Alexander, 2003):

1. El virus se encontró siempre entre las aves de corral, pero pasaba desapercibido hasta que se desarrollo la avicultura comercial como industria.
2. Los virus virulentos eran enzoóticos en especies en donde la enfermedad se presenta de forma mucho menos severa.
3. El virus virulento emergió por mutación de virus menos virulentos.

Hasta hace pocos años la opinión general había sido que la segunda explicación era la más probable. La primera se consideraba posible pero poco probable debido a que en la actualidad existe una amplia presencia de brotes en animales de traspatio en algunas partes del mundo. La tercera tampoco se consideraba probable ya que no existían reportes de mutaciones de otros virus de esta manera, y el grado del cambio genético necesario sería muy grande para producir una mutación (Alexander, 2003).

La segunda explicación fue aparentemente apoyada por el hallazgo durante la panzootia entre 1970-1973 de virus que fueron introducidos en algunas áreas geográficas por el movimiento de aves silvestres cautivas, especialmente especies psitácidas, las cuales muestran cierta resistencia a los virus virulentos para pollos. Aunque las aves en cautiverio han mostrado frecuentemente que pueden ser infectadas con el vENC virulento, se ha sugerido que esto podría ser el resultado del contacto con aves de corral infectadas. Aparte de los cormoranes en Norte América y posiblemente las palomas, existe poca evidencia de que las aves silvestres sirvan de reservorios del vENC virulento (Alexander, 2003).

El primer indicio de la tercera explicación, que los virus virulentos emergieron de virus de baja virulencia por mutación, se da a partir de un brote en pollos en Gran Bretaña en 1984 (Alexander, 2003). La caracterización antigénica con MABs detectó las similitudes entre los aislamientos provenientes de palomas que morían en los alrededores de las tiendas que vendían alimentos para animales en los muelles de Liverpool y los aislamientos obtenidos de pollos infectados en varias localidades a través de Gran Bretaña. La similitud antigénica confirmó el enlace epidemiológico entre la enfermedad en palomas y los brotes en pollos. Se ha demostrado un incremento similar en virulencia después de pasajes subsecuentes en pollos de algunos aislados de palomas, probando que lo ocurrido naturalmente podía ser reproducido experimentalmente (King, 1999); aunque se utilizaron cepas con diversidad antigénica, no ocurrió ningún cambio antigénico o del lugar de división de la proteína F asociado con el cambio en la virulencia de estas cepas (King et al, 2002). También se ha demostrado que los virus responsables de los brotes de la ENC en Irlanda en 1990, estaban estrechamente relacionados a virus de baja virulencia usualmente aislados de aves acuáticas, ambas cepas eran antigénicamente y genéticamente distintas de todas las otras cepas del vENC. Los virus virulentos mostraron cuatro diferencias en los nucleótidos de la parte de la codificación de aminoácidos 112 y 117 del gen F, tres de estos resultaron en un cambio en el asumido motif mínimo para la virulencia, y el cuarto otorgando una lisina en el sitio 112 (Alexander, 2001). Mucho mejor evidencia de la mutación a la virulencia ha provenido del brote entre 1998-2000 sucedido en Australia. Estudios filogenéticos demostraron que los virus responsables de los brotes en Australia en 1998 y 1999 se encontraban estrechamente relacionados entre si y a su vez a un virus de baja virulencia aislado de pollos en la misma área geográfica. Esto sugirió que el virus virulento emergió por mutación, que en este caso, sólo requirió de dos puntos de mutación. Además, se lograron aislar otros virus con cambios distintos en los sitios de división, incluyendo aquellos virus intermedios a los dos virus que fueron aislados inicialmente. Existen muchas posibilidades que los virus virulentos que emergieron en Australia en 1998 hayan sido el resultado de mutaciones de virus de baja virulencia, y no existe ningún motivo para pensar que otras mutaciones similares no hayan ocurrido en el pasado (Alexander, 2003).

Cuadro N° 4: Secuencia de nucleótidos/aminoácidos en el lugar de división de la proteína F de virus de alta y baja virulencia aislados en Australia en 1998

Virus	Virulencia	Secuencia de nucleótidos/ aminoácidos en el lugar de división de la proteína F
1154/98	Baja	GGA AGG AGA CAG GGG CGT CTT ¹¹¹ GRROGR*L ¹¹⁷
1238/98	Alta	GGA AGG AGA CAG AGG CGT ITT ¹¹¹ GRRQRR* F ¹¹⁷
1249/98	Alta	GGA AGG AGA CAG AGG CGT ITT ¹¹¹ GRRQRR* F ¹¹⁷

Fuente: Alexander et al, 2004

No esta claro si las mutaciones se dan lugar en aves silvestres y luego son pasadas a aves comerciales o si ocurren una vez que el virus ha sido introducido a las aves comerciales. La falta de aislamientos de cepas virulentas a partir de aves silvestres, sugiere que es más probable que ocurra la mutación una vez que el virus a ingresado a las aves comerciales (Alexander et al, 2004). No existe evidencia de que las aves silvestres hayan jugado un papel en el origen de estas cepas virulentas y los factores que precipitaron el cambio son desconocidos hasta el momento (King, 2002).

En todo caso, la mayor parte de los brotes de ENC con cepas virulentas son el resultado de virus altamente virulentos circulantes en la avicultura y no de la mutación de cepas de baja virulencia a cepas de alta virulencia (Swayne, 2003a).

Si las cepas virulentas del vENC pueden emerger a partir de aquellas de baja virulencia por mutación, esto podría tener una importante repercusión en los actuales métodos de control de la enfermedad, sobretudo por la enorme cantidad de vacunas vivas utilizadas a nivel mundial (Alexander et al, 2004).

El reporte de ocurrencias de mutaciones de una cepa de baja virulencia a una de alta virulencia es raro dadas las oportunidades que existen. Estas oportunidades incluyen el amplio uso de vacunas lentogénicas y la continua exposición de las aves a cepas de campo de baja virulencia (King, 1999). Además, debido a que presentan un genoma de cadena simple y lineal, el reordenamiento de las cepas del vENC debería ser poco frecuente (Swayne, 2003a).

IV. Patología y Epidemiología

4.1. Incidencia y Distribución

La utilización casi universal de vacunas contra la ENC en la avicultura comercial a nivel mundial hace casi imposible la determinación de la verdadera distribución geográfica de la enfermedad (en términos de aves infectadas con virus virulento) (Alexander, 2003). Sin embargo se han demostrado infecciones en todos los continentes incluyendo la Antártica (King, 2002).

Aunque el monitoreo internacional de la ENC es llevado a cabo por instituciones como la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (FAO, 1985) y la OIE (Office International des Epizooties), las figuras producidas podrían no ser representativas de la verdadera distribución del vENC (Alexander, 2003) ya que en algunos países o áreas la enfermedad no se reporta del todo o sólo se reporta cuando sucede en aves comerciales, ignorando la presencia del vENC en animales de traspatio o en crianza de aldeas (Alexander et al, 2004). Por lo general se hace una distinción de la ENC entre aves comerciales y aves de traspatio cuando se reporta un brote (Alexander, 2003). Ante la OIE, la única enfermedad que presenta un mayor número de brotes que la ENC es la fiebre aftosa (Villegas, 2003). Vale la pena mencionar que se han reportado bastante más frecuentemente las formas virulentas de la ENC que las de Influenza Aviar altamente patogénica, por lo que se le considera a nivel global una enfermedad mucho más común, por ejemplo, en el 2001 se reportaron brotes de la ENC en 63 países, mientras que la IA altamente patogénica sólo se reportó en dos países (Swayne, 2003a).

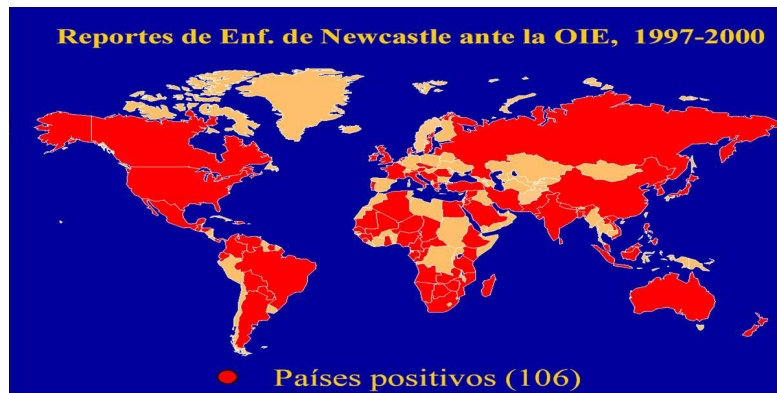
No existe duda que el vENC es o enzoótico o una causa regular de epizootias en la mayor parte de África, Asia, Centro América y partes de Sudamérica. En zonas más desarrolladas,

como Europa Oriental, ocurren epizootias esporádicas de forma bastante común inclusive con el amplio uso de vacunación (Alexander, 2003).

La distribución del vENC es dependiente de los intentos de erradicación y control realizados en distintos países. El éxito de tales medidas es, al mismo tiempo, dependiente de la naturaleza de la industria avícola (países con mayoría de animales en parvadas de traspatio, tienen problemas mucho más serios que aquellos con la mayoría de animales en grandes poblaciones comerciales) (Alexander, 2003).

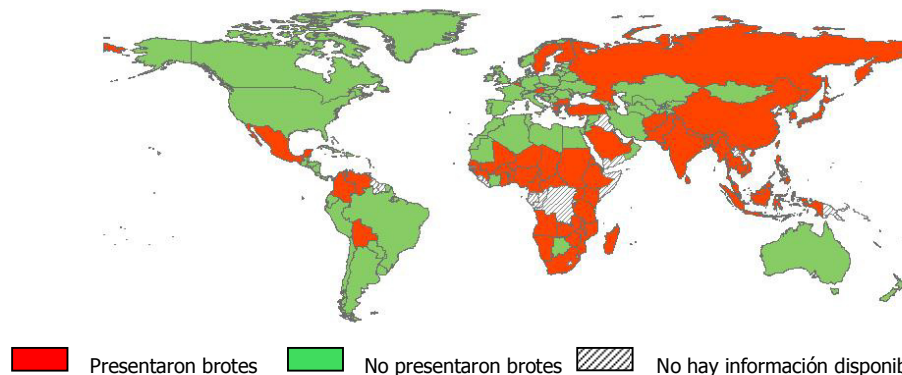
Incluso en países que han sido reconocidos por largos periodos como libres de ENC, al realizar monitoreos se revelan infecciones asintomáticas con virus avirulentos que presumiblemente se ha diseminado de aves acuáticas y otras aves silvestres (Alexander et al, 2004).

Imagen N° 8: Países que presentaron brotes de la ENC durante entre 1997 y 2000 ante la OIE



Fuente: Swayne, 2003b

Imagen N° 9 Países que presentaron brotes de la ENC durante el año 2004 ante la OIE



Fuente: OIE, 2005c

La naturaleza de la diseminación del vENC también afecta a la distribución. Diversos autores coinciden que probablemente han ocurrido cuatro grandes panzoótias de la ENC desde la primera vez que la enfermedad fue reconocida (Alexander, 2001; Antillon, 2005; Liu et al,

2005; Yu et al, 2001; King, 2002; Jordan, 1990; Brown et al, 2003; Alexander et al, 2004) y existe un consenso general sobre lo que constituyen las dos primeras panzootias, sin embargo existen importantes diferencias según los distintos autores sobre lo que se considera la tercera y cuarta panzootia.

La primera panzootia representa los brotes iniciales de la enfermedad y parece haberse iniciado al sureste de Asia. Se considera que la enfermedad se movió lentamente a través de Asia rumbo a Europa y que los brotes aislados como el de Inglaterra en 1926 fueron debido a la introducción oportunista del virus precediendo al flujo mayor del virus en el resto de Europa. Esta teoría de la diseminación panzootica del vENC significaría que al virus, que aparentemente surgió en 1926, le tomo más de 30 años para esparcirse a nivel mundial y seguía siendo importante en la mayor parte de los países en los primeros años de los 60s (Alexander, 2003; Jordan, 1990; Docherty et al, 2001; Antillon, 2005; Liu et al, 2005; Brown et al, 2003; Alexander et al, 2004).

En un marcado contraste, la segunda panzootia aparentemente se inició en el Medio Oriente a finales de la década de los 60s y llegó a la mayoría de los países para 1973. La mayor velocidad para la diseminación de esta segunda panzootia podría haberse debido a que la industria avícola había sufrido una mayor revolución, en donde se desarrolló en una industria comercial con un considerable comercio internacional (Alexander, 2003) y a que la comercialización de alimentos para aves significó a un mayor contacto entre granjas separadas por el movimiento de los camiones de reparto (Alexander et al, 2004). Adicionalmente, el virus responsable de esta panzootia parece haber estado relacionado con la importación de especies psitácidas en cautiverio. La enorme comercialización de estas aves, las cuales involucraban transportes aéreos rápidos, se considera uno de los principales factores en la diseminación de la enfermedad. El serio efecto que tuvo esta segunda panzootia en las industrias avícolas en la mayor parte de los países, llevó al desarrollo de vacunas y programas que proveyeron una importante protección en las aves. Adicionalmente, la mayoría de países impusieron nuevas medidas de control para la importación de aves exóticas (Alexander, 2003; Jordan, 1990; Docherty et al, 2001; Antillon, 2005; Liu et al, 2005; King, 2002; Brown et al, 2003).

Alexander (2003); Brown et al (2003) y Alexander et al (2004) mencionan que basándose en evidencia antigénica y genética probablemente hubo una distribución mundial de un tercer virus virulento a finales de la década de los 70s. El inicio y diseminación de esta tercera panzootia es poco clara, se presume que como resultado del uso casi universal de las vacunas desde mediados de los años 70s, las aves podrían haber estado protegidas contra la enfermedad, pero en la mayoría de los casos permitieron la replicación y diseminación del virus. Mientras que Liu et al (2005); Jordan (1990) y Docherty et al (2001) indican que la tercera panzootia fue a causa del PPMV-1 que aparentemente se inició en el Medio Oriente y se diseminó a nivel mundial. El origen se estima a fines de la década de los 70 y estuvo presente durante la de los 80. Se incrimina a las palomas como las responsables de esta pandemia

siendo además las aves principalmente afectadas, en donde el cuadro fue principalmente neurotrópico y entérico. En algunos países esta pandemia llegó a afectar también a pollos.

En cuanto a la cuarta panzootia Alexander (2003); Brown et al (2003) y Alexander et al, (2004) consideran que los colúmbidos, que fueron genéticamente ignorados como fuente potencial del vENC (aunque existen en un gran número en la mayoría de países), fueron los responsables. Este grupo de aves comprende a las palomas (*Columba livia*) y cuculíes (*Zenaidra sp.*) que son criados para carreras, exposiciones o con propósitos alimenticios. En la mayoría de los países europeos existen poblaciones de varios millones de palomas y estas fueron las aves principalmente afectadas con la cuarta panzootia de la ENC. La enfermedad, la cual asemejó el cuadro neurotrópico en pollos pero sin signos respiratorios, aparentemente se originó en el Medio Oriente a mediados de la década de los 70s. Para 1981, había alcanzado Europa y luego se diseminó rápidamente al resto del mundo, básicamente como resultado del contacto de aves en carreras y exposiciones y el amplio comercio internacional de estas aves. La naturaleza variante de este virus permitió la demostración inequívoca de la infección en 24 países distintos. La diseminación hacia los pollos ha sucedido en varios países, incluyendo Gran Bretaña en donde ocurrieron 20 brotes en pollos no vacunados en 1984 como resultado de la contaminación del alimento a partir de palomas infectadas. La enfermedad en palomas ha sido reconocida por más de dos décadas, pero aún parece permanecer enzoótica en palomas de carrera en muchos países, con diseminación regular a palomas salvajes y es considerada una amenaza constante para las aves de corral. Mientras que Antillon (2005), Liu et al (2005) y Yu et al (2001) consideran que la cuarta panzootia se inició a finales de los 80s y permaneció durante los 90s logrando diseminarse a todo el mundo afectando mayormente a la avicultura comercial, apoyando su afirmación en que se realizó la caracterización de distintas cepas y se proveyó la evidencia para el enlace epidemiológico entre los brotes de Asia, Medio Oriente, África y Europa en los 90s; inclusive consideran que en la actualidad seguimos viviendo la cuarta panzootia. Finalmente, Docherty et al (2001) cuestionan si los brotes sucedidos en cormoranes en los años 90s indicarían la presencia de la cuarta panzootia.

En Europa occidental hubo un marcado incremento de brotes reportados durante el inicio de la década de los 90s, llegando al pico con 239 brotes dentro de la Comunidad Europea (EU) en 1994 (Alexander et al, 2004). Estos brotes han afectado tanto a pollos de engorde como a ponedoras comerciales, observándose casos con altas mortalidades y lográndose aislar cepas velogénicas viscerotrópicas (Villegas et al, 1995). La distribución sugería que se trataba de una sola epidemia desde los inicios hasta mediados de la década de los 90s, pero, en realidad, evidencia antigénica y filogenética indican que diversas cepas virales fueron las responsables de estos brotes. Entre 1991 y 1995 la mayoría de los brotes ocurridos en la EU ocurrieron en los países Benelux (Bélgica, Países bajos y Luxemburgo) y Alemania, predominantemente en aves de traspatio. La mayoría de los brotes a partir de 1995 han sido en este tipo de aves. Una de las más extensas epidemias en Europa occidental ocurrió en Italia en el 2000 en donde se

confirmaron 254 brotes, una vez más, mayormente en aves de traspatio (Alexander et al, 2004).

Un aspecto notable de los brotes durante la década de los 90s fue que se presentaron en países que habían estado libres de la enfermedad por muchos años. Entre 1995 y 1999, se presentaron 18 brotes en Dinamarca, 2 en Finlandia y 27 en Irlanda del Norte. También hubo uno en Suecia, uno en Noruega y 1 en Irlanda. Todas estas áreas de Europa occidental habían sido declaradas libres de ENC y eran monitoreadas regularmente por medio de pruebas serológicas no obteniendo evidencia de infecciones por el vENC a excepción de incursiones ocasionales de virus avirulentos típicamente diseminados a partir de aves silvestres (Alexander et al, 2004).

Desde el brote de 1932, Australia había estado libre de vENC virulentos. Sin embargo, desde 1966, se había reconocido que virus similares a los del patotipo entérico asintomático estaban presentes en aves silvestres en Australia, y en ocasiones se habían diseminado a parvadas de aves comerciales. Dos brotes de vENC virulentos ocurrieron en Australia en 1998 y otros brotes han sido reportados en 1999 y en el 2000 (Alexander et al, 2004).

Durante los años 1999 y 2000, han ocurrido brotes de la ENC en todo el mundo, dichos brotes han comprometido a mas de 100 000 aves en Brasil, Honduras, Italia y México. Otros reportes acerca de brotes de la ENC, incluyen los ocurridos en Canadá (1997), México (2000-2001), América central (2000) y los EEUU (1998, 2002-03). A finales de Septiembre del 2002, en el sur de California ocurrió un brote en aves comerciales, éste se diseminó a otras granjas vecinas aislándose el virus velogénico viscerotrópico de la ENC a partir de tejidos tomados de pollos enfermos que presentaban lesiones compatibles con la enfermedad. Subsecuentes investigaciones epidemiológicas en abril del 2003 revelaron que muchas zonas en el sur de California fueron despobladas debido a la enfermedad (Vargas, 2003). Debido a este brote se analizaron muestras de especies aviares no comerciales, 57 especímenes de 25 especies diferentes fueron positivas para el vENC, todas estas aves se encontraban o dentro de granjas infectadas o dentro de un radio de 1 Km. de éstas (Kinde et al, 2005)

El monitoreo de los virus responsables de las panzoótias es bastante complicado, ya que aparentemente los virus con características genéticas o antigénicas no necesariamente desaparecen mientras otras variantes surgen, y pueden continuar siendo aisladas muchos años después de su primera aparición (Alexander, 2003).

Se ha realizado una investigación sobre los reportes de la OIE de los años 2004 y 2005 siendo los principales brotes y las características más saltantes las siguientes (OIE, 2005b):

- Senegal, Mayo 2004: Se confirmó un brote aislado.
- Turquía, Junio 2004: Se aisló el virus en pollos de carne de 35 días de edad. La infección se originó a partir de aves silvestres.
- Venezuela, Junio 2004: Se comprobó la presencia del virus velogénico viscerotrópico en una granja comercial de pollos de carne, la cual había descuidado el programa de

vacunación preventiva. Se sospecha que se trata de un virus de campo que debido a múltiples pasajes se convirtió en altamente patogénico.

- Suecia, Julio 2004: Se comprobó la presencia de la ENC en gallinas de postura, se sospecha que el origen de la infección fueron aves silvestres. La vacunación esta prohibida en el país.
- Tailandia, Julio 2004: vENC confirmado en pollos nativos, patos y gansos.
- Sudáfrica, Septiembre 2004: Se comprobó la presencia del virus velogénico viscerotrópico en tres granjas vecinas, considerándosele como un solo brote. Se vieron afectados pollos de carne, reproductoras pesadas jóvenes y pollos no comerciales. No se han presentado nuevos brotes.
- Chipre, Noviembre 2004: Se confirmó la presencia del virus en palomas y perdices silvestres. Como respuesta al brote se procedió a la vacunación de pollos de carne, reproductoras pesadas, ponedoras comerciales, perdices, faisanes, avestruces y aves de jaula. Se reportaron 3 brotes adicionales que afectaron a palomas, pavos reales, gansos y gallinas de guinea. La avicultura comercial aplica un programa de vacunación sistemático.
- Finlandia, Julio 2004: Se presentó un brote en pavos, la fuente más probable de infección se considera que fueron aves silvestres. La vacunación contra la ENC esta prohibida en el país. No se han presentado nuevos brotes.
- Japón, Abril 2005: Se realizo el aislamiento viral a partir de pollos comerciales.
- Francia, Julio 2005: Se confirmó la presencia del vENC en faisanes y perdices comerciales. Se sospecha que la fuente fueron aves migratorias. No se han presentado nuevos brotes.
- Grecia, Julio 2005: Se presentó un brote en una granja comercial. No se han presentado nuevos brotes.
- Reino Unido/Inglaterra, Agosto 2005: Se presentó un brote único por la introducción del virus de una fuente externa.
- Botswana, Agosto 2005: Se presentó un brote aislado. No se había vacunado a los animales en todo el año previo al brote.
- Bulgaria, Agosto 2005: Se logró aislar al virus en aves de traspatio no vacunadas. La fuente del agente fueron palomas silvestres. No se han presentado nuevos brotes.
- Israel, Agosto 2005: Se presento un brote aislado. No se han presentado nuevos brotes.

4.2. Huéspedes Naturales y Experimentales

Se ha demostrado que el vENC es capaz de infectar a todas las especies mayores y menores de aves domésticas, aunque algunas especies (por ejemplo patos y gansos) tienden a mostrar menos signos de enfermedad, incluso cuando son infectadas con las cepas más virulentas para

pollos (Jordan, 1990). Hay diversas opiniones sobre la susceptibilidad entre las aves de traspatio y las líneas comerciales, algunos establecen que las aves de traspatio son más resistentes que las líneas comerciales, mientras que otros mencionan que no hay evidencia para diferenciar el grado de susceptibilidad entre ambos grupos (Ferrer, 2005).

De la literatura disponible, se concluye que además de las especies aviares domésticas, se ha demostrado la infección natural o experimental con el vENC en al menos 250 especies (Carter et al, 2005) pertenecientes a 27 de los 50 órdenes de aves (Brown et al, 2003). Se han recalcado las variaciones en la severidad de los signos clínicos, incluso con distintas especies del mismo género. Parece razonable concluir que la mayor parte de las aves, si no todas, son susceptibles a la infección, pero la enfermedad aparente para cualquier cepa específica puede variar considerablemente dependiendo del huésped (Alexander, 2003).

4.3. Transmisión y Diseminación

La ENC es altamente contagiosa (Carter et al, 2005). La infección se puede llevar a cabo por inhalación o ingestión y la diseminación de un ave a otra depende de la disponibilidad del virus en forma infecciosa. (Alexander, 2003). El modo de transmisión de ave a ave es claramente dependiente de los órganos en donde el virus se replica (Jordan, 1990).

Aves que muestran signos respiratorios probablemente alberguen virus en las mucosidades eliminadas (Jordan, 1990). Es fácil asumir que el vENC es transmitido principalmente por aerosol fino o gotas gruesas que son inhaladas por aves susceptibles. Sin embargo no existe evidencia experimental para probar esto concluyentemente. Es claro que virus infecciosos podrían estar presentes en aerosoles y que aves ubicadas en ambientes que contengan estos aerosoles se infectan. Esta es la base para la aplicación de vacunas vivas por spray y aerosol. En infecciones ocurridas de forma natural, gotas pequeñas y grandes conteniendo virus infeccioso serán liberadas de aves infectadas como resultado de la replicación viral en el tracto respiratorio o como resultado del polvo u otras partículas, incluyendo las heces. Estas partículas cargadas de virus podrían ser inhaladas o chocar contra las membranas mucosas, resultando en la infección. La habilidad de estos aerosoles para formar y soportar virus infecciosos por un periodo de tiempo suficiente para la transmisión, depende de los factores ambientales (Alexander, 2003) como temperatura, humedad y densidad (Alexander et al, 2004).

Durante el curso de la infección grandes cantidades de virus son excretadas en las heces. La ingestión de las heces resulta en la infección; esta es probablemente la mayor causa de diseminación entre aves de las cepas entéricas avirulentas y la variante de paloma, donde ninguna de las dos produce normalmente signos respiratorios en aves infectadas (Alexander, 2003; Jordan, 1990).

La transmisión vertical sigue siendo controversial. La verdadera importancia de dicha transmisión en epizootias de la ENC aún no es clara. Evaluaciones experimentales utilizando virus virulentos por lo general resultan en el cese de la postura en aves infectadas. Se han

reportado embriones infectados durante infecciones naturales con virus virulentos, pero esto generalmente produce la muerte del embrión durante la incubación. Huevos infectados rajados o rotos podrían servir como fuente de infección para pollos BB recién nacidos, así como las heces cargadas de virus que contaminan las cáscaras. Los virus también podrían penetrar la cáscara después de la postura, complicando aún más la determinación de una verdadera transmisión vertical o transovárica. Se pueden lograr pollitos de huevos infectados con virus lentogénicos o vacunales que no necesariamente ocasionan la muerte del embrión. En infecciones naturales, no está claro como es que los embriones se llegan a infectar, aunque se ha demostrado que la vacuna La Sota está presente en la mayoría de los órganos reproductores después de la vacunación (Alexander, 2003). Cepas lentogénicas y el vENC apatógeno podrían ser transmitidos a través de la membrana vitelina. Esta ruta de transmisión se piensa que es común luego de la vacunación con vacunas vivas con cepas lentogénicas (Hitchner, B1) (Gerlach, 1994). Se ha podido demostrar la presencia de virus lentogénicos en embriones y progenie joven, incluyendo pollitos BB de un día, de lotes de aves reproductoras vacunadas. En otro estudio donde se investigaba el inesperado aislamiento de virus virulento de embriones de pollo, se pudo aislar vENC virulento de hisopados cloacales de aves que habían puesto los huevos, a pesar de los altos títulos para la ENC de las reproductoras y de la progenie (Alexander, 2003). Recientemente se han observado antígenos específicos del vENC en el contenido intestinal además de anticuerpos específicos circulantes en pollos de un día de edad, por lo que este modo de transmisión sigue en discusión (Roy et al, 2005).

Muchos factores entran en juego para determinar la velocidad de la diseminación, por ejemplo, virus transmitidos por la vía respiratoria en una parvada de pollos de carne alojados a una gran densidad se pueden diseminar a una velocidad alarmante; mientras que virus eliminados en heces y transmitidos exclusivamente por la vía fecal-oral en gallinas de postura alojadas en jaula pueden diseminarse muy lentamente (Jordan, 1990).

Las siguientes fuentes virales o métodos han sido implicados en varias de las epizootias (Alexander, 2003; Gerlach 1994; King, 1999):

1. Movimiento de aves vivas (Aves silvestres, mascotas, aves de riña, palomas mensajeras, aves comerciales, etc.)
2. Contacto con otros animales
3. Movimiento de personas y equipos
4. Movimiento de productos avícolas
5. Diseminación por el aire
6. Alimento contaminado para aves
7. Agua contaminada
8. Vacunas
9. Insectos
10. Roedores

La importancia de cualquiera de estos factores dependerá de la situación en la que la epizootia ocurra (Alexander, 2003).

Básicamente todos los aislamientos de vENC obtenidos a partir de aves silvestres han sido de baja virulencia, por lo que este tipo de aves jugarían un rol más significativo en la diseminación dentro del área una vez que la infección se da en aves de corral (Alexander et al, 2004). En países en donde las aves de corral son criadas exclusivamente en galpones a prueba de aves, la habilidad de las aves silvestres para invadir parvadas afectadas y transmitir la enfermedad es mínima, mientras que en aves mantenidas en espacios abiertos es más probable que se infecten a partir de cepas transportadas por aves silvestres. En Canadá y el norte de los EEUU, ocurrieron brotes que afectaron a cormoranes y pelícanos en 1990 y 1992. Se pudo aislar en pavos un virus indistinguible por batería de MABs y en esencia genéticamente el mismo al de los cormoranes. Los pavos mostraron signos neurotrópicos velogénicos de la ENC, éstos habían sido criados abiertamente cerca al lago donde estaban muriendo las aves marinas (King, 1999). También se ha pensado que los 11 brotes confirmados en pollos y pavos en Gran Bretaña en 1997 podrían haber sido el resultado de la introducción primaria del agente viral causal por aves migratorias. Investigaciones epidemiológicas sugirieron que la mayor parte de los brotes fueron el resultado de diseminaciones secundarias por los humanos a partir de uno o dos focos primarios. La secuenciación de nucleótidos y el análisis filogenético mostraron similitudes muy estrechas entre los aislamientos en Gran Bretaña y los virus responsables de los brotes de ENC en los países Escandinavos en 1996, incluyendo el aislamiento de un ave acuática silvestre. Los inusuales patrones de movimiento de las aves migratorias a finales de 1996 y el comienzo de 1997 sugieren que estas podrían haber servido de vehículo para la introducción primaria del vENC a Gran Bretaña (Alexander, 2003). Las aves silvestres y otros animales exóticos sin duda han contribuido a la diseminación de la enfermedad, pero hasta el momento su rol exacto no ha sido evaluado totalmente (Jordan, 1990). A pesar del comercio internacional de aves exóticas cautivas y el frecuente aislamiento de vENC virulentos de dichas aves, la amenaza de la introducción y diseminación por esta fuente (como en la epizootia en California entre 1971-1972) ha sido ampliamente reducida con estrictos procedimientos de cuarentena en la importación. Aves de contrabando o aquellas retiradas prematuramente de la cuarentena pueden, sin embargo, seguir siendo una gran amenaza, desde 1974 hasta 1981 se han logrado aislar 147 virus virulentos de aves cautivas mantenidas en cuarentena en los EEUU. Hubo una particular preocupación en 1991 cuando ocurrieron brotes en aves mascotas importadas ilegalmente en seis estados pero no ocurrió diseminación a las aves de corral (Alexander, 2003; Alexander et al, 2004).

Aves inmunes pueden funcionar como portadoras y eliminar el virus intermitentemente. Las infecciones persistentes se encuentran limitadas a semanas o meses. Los portadores más comunes incluyen aves acuáticas silvestres, pittida, psitacíformes, algunos passeriformes y stringiformes (Gerlach, 1994; OIE, 2002; Kitching, 2004).

Las palomas de carrera también son una fuente potencial de diseminación de la enfermedad como ha sido ampliamente demostrado en los últimos diez años (Alexander et al, 2004).

El comercio entre parvadas de traspatio y la tenencia de otras aves para fines recreacionales (como hobbies) también han sido implicadas en la diseminación de la ENC en los brotes ocurridos en la EU en los años 90s (Alexander et al, 2004).

El movimiento de aves comerciales vivas también juega un rol fundamental en la diseminación de la enfermedad (Jordan, 1990).

La diseminación por aire ha sido considerada importante en algunas epizootias como los brotes ocurridos en 1970-1971 en Inglaterra pero poco importante en otros como los de 1971-1972 en California incluso cuando todo indica que el mismo virus estuvo involucrado en ambos brotes (Alexander, 2003). Se ha logrado detectar virus a 64 metros de granjas infectadas en la dirección del viento, por lo que es posible que, cuando las condiciones climáticas son las adecuadas y las granjas avícolas están altamente concentradas, la diseminación por aire tenga un rol significativo en la epidemiología de la ENC. Sin embargo, en los años recientes, esta vía no ha sido responsabilizada en ninguno de los brotes (Alexander et al, 2004).

Sin duda, el mayor potencial para la diseminación el vENC lo representan los humanos y sus equipos. Los humanos se pueden infectar con el vENC en la mucosa conjuntival, y esto podría funcionar como un medio de diseminación, pero el método más probable es la transferencia mecánica de material infectivo (sobretudo heces). Los medios de transporte modernos permiten que el personal se traslade rápidamente a cualquier país del mundo, así que la diseminación por humanos no debería ser tratada meramente como una amenaza local o nacional. Los grupos de vacunadores movilizándose de granja a granja han sido implicados en la diseminación de la ENC (Alexander, 2003).

Las buenas prácticas de manufactura deben asegurar que las vacunas no sean portadoras de virus virulentos de la ENC, sin embargo, en el pasado, aves han sido infectadas por vacunas para otras enfermedades al haber estado éstas contaminadas con el vENC. Además se han producido infecciones por la incompleta inactivación de las vacunas contra la ENC (Alexander et al, 2004).

En algunos casos, más de un factor se combina en la diseminación de la enfermedad. Por ejemplo para los brotes de 1984 en Gran Bretaña se consideró que la diseminación ocurrió por alimento que había sido contaminado por palomas silvestres infectadas (Alexander, 2003). De forma parecida, el agua contaminada con heces infectadas podrían diseminar la enfermedad (Alexander et al, 2004).

La habilidad del virus para sobrevivir en animales muertos o excreciones es básica para la diseminación de la enfermedad. El vENC puede sobrevivir en carcasas infectadas por varias semanas a temperaturas ambientales cálidas o por varios años si se le mantiene bajo congelación. Las heces, en donde el virus puede estar presente en grandes cantidades, también representan un excelente medio para la sobrevivencia del virus, donde se ha mantenido la infectividad por más de un mes incluso a 37°C (Jordan, 1990; OIE, 2002).

La carne de pollo ha sido considerada como uno de los principales vehículos de transmisión, sin embargo, métodos modernos en la preparación de carcasas de aves, así como la legislación sobre la alimentación con carne no tratada a aves ha disminuido considerablemente el riesgo a partir de productos avícolas, aunque aún persiste la posibilidad de diseminación por esta forma (Alexander et al, 2004).

La diseminación de la enfermedad a partir de especies no aviares probablemente se deba a la transferencia mecánica de heces infectivas, como por ejemplo insectos, roedores o animales carroñeros. En países cálidos, los reptiles podrían ingresar a los galpones y no deben ser ignorados como potenciales diseminadores del vENC ya que se ha reportado la susceptibilidad a la infección por parte de estos animales (Alexander et al, 2004). Ratones atrapados durante la limpieza y desinfección de los galpones de una granja mostraron ser portadores del VVND (King, 1999).

4.4. Periodo de Incubación

El periodo de incubación de la ENC después de la exposición natural ha sido reportado de entre 2 a 15 días (como promedio de 5 a 6). La velocidad con la que los signos aparecen, si es que aparecen, es variable dependiendo de la infectividad del virus, la especie huésped, la exposición previa al virus, la edad, el estado inmunológico, las infecciones concomitantes, las condiciones ambientales, la vía de exposición y la dosis (Alexander, 2003; Gerlach, 1994).

4.5. Signos Clínicos

Las manifestaciones clínicas de la ENC permanecen sin cambio alguno desde las primeras descripciones de las formas virulentas de la enfermedad, descritas inicialmente en 1926, los reportes de formas menos patogénicas de la enfermedad en las décadas de los 40s y 50s, y la posterior identificación de infecciones asintomáticas en la década de los 60s (King, 1999).

Los vENC pueden ser agrupados en patotipos en base a los signos clínicos, los cuales, a su vez, están afectados por la cepa viral. Otros factores también importantes en el establecimiento de la severidad de la enfermedad son la especie huésped, la edad, el estado inmune, la coinfección con otros organismos, el estrés ambiental, el estrés social, la vía de exposición y la dosis viral (King, 1999; Alexander, 2003; Carter et al, 2005; Jordan, 1990).

Con los virus extremadamente virulentos, la enfermedad puede aparecer súbitamente, con una alta tasa de mortalidad en ausencia de otros signos clínicos. En brotes en pollos a causa del patotipo velogénico viscerotrópico (VVND), los signos clínicos frecuentemente se inician con inapetencia, incremento en la frecuencia respiratoria y debilidad; seguidos de un severo malestar respiratorio (boqueo y tos) y diarreas (Carter et al, 2005; OIE, 2002); finalizando con postración y muerte. Durante la panzootia ocasionada por este tipo de virus entre 1970 y 1973, la enfermedad en algunos países como Gran Bretaña y el norte de Irlanda estuvo marcada por signos respiratorios severos mientras que en otros países estos estuvieron ausentes (Alexander, 2003). Este tipo de vENC puede ocasionar edema alrededor de los ojos,

cabeza y barbas (Alexander, 1998). Frecuentemente se observa diarrea verdosa en aves que no mueren en la infección temprana, y antes de la muerte se pueden volver aparentes temblores musculares, tortícolis, parálisis de las piernas y alas y opistótonos. La mortalidad frecuentemente alcanza el 100% en parvadas de pollos completamente susceptibles (Alexander, 2003). Es común también encontrar opacidad en la córnea (Antillon, 2005).

La forma velogénica neurotrópica (NVND) de la ENC ha sido reportada mayormente en los EEUU. En pollos, se caracteriza por el apareamiento repentino de enfermedad respiratoria, seguida uno o dos días más tarde por signos neurológicos que incluyen parálisis de las patas y alas, torcimiento de la cabeza y cuello, andar en círculos, temblores y caminar hacia atrás (Carter et al, 2005; OIE, 2002). La diarrea por lo general se encuentra ausente. La presencia de huevos sin cáscara o con cáscara blanda, seguido del cese completo de la postura podría ser un signo temprano de la enfermedad en aves adultas (Jordan, 1990). Se suelen encontrar huevos deformes, con cáscara rugosa o con albúmina acuosa (OIE, 2002). La morbilidad puede alcanzar el 100%, mientras que la mortalidad es considerablemente más baja, aunque se ha reportado hasta del 50% en aves adultas y del 90% en aves jóvenes (Alexander, 2003).

Las cepas mesogénicas del vENC por lo general ocasionan enfermedad respiratoria en infecciones de campo, los signos incluyen depresión, tos y estornudos (Carter et al, 2005). En aves adultas, podría presentarse una marcada caída en la producción de huevos la cual puede durar por varias semanas (Alexander, 2003). En aves jóvenes pueden ocurrir signos nerviosos poco después que aparezcan los signos respiratorios, estos no son comunes e incluyen caída de las alas, posición anormal de la cabeza y el cuello y parálisis (Carter et al, 2005). La mortalidad en la parvada por lo general es baja, con excepción de aves muy jóvenes y animales susceptibles (hasta el 50%), esta puede ser afectada considerablemente por condiciones exacerbantes (Alexander, 2003; Carter et al, 2005; Jordan, 1990).

Los virus lentogénicos usualmente no ocasionan enfermedad en aves adultas. En aves jóvenes, totalmente susceptibles, la cepa más patogénica La Sota puede ocasionar problemas respiratorios serios con mortalidad después de la complicación con uno o más microorganismos o por malas prácticas de manejo, las cuales pueden favorecer la exacerbación de problemas respiratorios hasta el punto de ocasionar cuadros comparables con los de cepas más virulentas (Jordan, 1990). La vacunación o infección de pollos de carne cerca al beneficio con estos virus puede llevar a coliseptisemia o aerosaculitis con el subsecuente decomiso. (Alexander, 2003). Infecciones intestinales producidas por aislamientos de baja virulencia que no producen una enfermedad obvia, han sido denominadas como la forma entérica-asintomática (King, 1999).

El virus responsable de la panzootia en palomas durante la década de los años 80s indujo signos clínicos en infecciones de campo en palomas y pollos distintos a los de otros virus. En ambas especies, los signos clínicos predominantes fueron la diarrea y los signos nerviosos. En gallinas adultas, se observaron caídas precipitosas de la postura, y se registró una alta mortalidad en aves jóvenes. Este virus no produjo signos respiratorios en infecciones no complicadas con otros agentes ni en palomas ni en pollos (Alexander, 2003; Jordan, 1990).

Los signos clínicos producidos por virus específicos en otros huéspedes podrían diferir significativamente de los observados en pollos. En general, los pavos son tan susceptibles como los pollos a la infección con el vENC, pero los signos clínicos son menos severos por lo general. Aunque se ven infectados, patos y posiblemente gansos, estos son considerados como clínicamente resistentes incluso a las cepas del vENC más virulentas para pollos. Sin embargo, se han descrito brotes de enfermedad severa en patos infectados por el vENC. Se han reportado brotes de la ENC en la mayoría de aves de riña y la enfermedad es muy parecida a la de los pollos. En avestruces y otros ratites, los virus virulentos para pollos de la ENC no producen una enfermedad tan patogénica. Por lo general avestruces jóvenes pueden mostrar depresión y signos nerviosos, pero los adultos no se ven afectados (Alexander, 2000).

Si se conoce que la enfermedad está presente en un área determinada, los signos clínicos y las lesiones pueden ser considerados como altamente sugestivos, especialmente en crianza de aldeas. Los signos clínicos típicos son: postración y depresión de las aves, plumas erizadas, diarrea verdosa y/o blanquecina y en los sobrevivientes comúnmente se observa torción de la cabeza para algún lado, tortícolis, parálisis de las piernas o alas o algún otro tipo de signo neurológico. Otras características típicas de la enfermedad son la rápida diseminación, un período de incubación de 3 a 6 días, muerte de las aves a los 2 o 3 días alcanzando una tasa de mortalidad mayor al 50% en aves totalmente susceptibles (Alexander et al, 2004).

Imagen N° 10: Signos Clínicos

Severa depresión en aves con baja protección inmunológica



Cuadro respiratorio sin depresión en aves con buena protección inmunológica



Tremor y parálisis son signos nerviosos en aves en estado crítico de la enfermedad



Celulitis facial



Algunas aves muestran queratitis ocular



Torticólis



Fragilidad de la cáscara y albúmina acuosa pueden ser observadas en aves en producción



Opistótonos son observados en aves que sobreviven a la enfermedad



Signos nerviosos son observados en palomas inoculadas experimentalmente con una cepa virulenta



Fuente: Dra. Eliana Icochea - FMV-UNMSM

4.6. Patología

4.6.1. Lesiones Macroscópicas

Al igual que los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y los órganos afectados en aves infectadas con el vENC son dependientes de la cepa y el patotipo del virus infectivo, donde lesiones más severas serán observadas a partir de formas velogénicas (Carter et al, 2005), además, la especie afectada y otros factores pueden tener un efecto sobre la severidad de la enfermedad. No existen lesiones patognomónicas asociadas a ninguna forma de la enfermedad. También pueden estar ausentes las lesiones macroscópicas (Alexander, 2003). Los órganos afectados se relacionan directamente con los signos clínicos observados (Jordan, 1990). Se debe examinar un buen número de aves para poder dar un diagnóstico tentativo en base al tipo de lesiones (OIE, 2002).

Sin embargo, la presencia de lesiones hemorrágicas en el intestino de pollos infectados ha sido utilizada para distinguir VVND de NVND, una distinción de importancia para las medidas regulatorias en el diagnóstico de la ENC en los EEUU. Estas lesiones son por lo general particularmente prominentes en la mucosa del proventrículo, ciegos e intestino delgado (Carter et al, 2005; Jordan, 1990) y aparecen como resultado de la necrosis de la pared intestinal o el tejido linfoide como tonsilas cecales y placas de Peyer (Alexander, 2003).

Las carcasas de animales que mueren a causa de virus virulentos por lo general tienen una apariencia febril y de deshidratación (Alexander et al, 2004).

Generalmente, las lesiones macroscópicas no son visibles en el sistema nervioso central de aves infectadas con vENC, independientemente del patotipo presente (Alexander, 2003).

No siempre están presentes los cambios patológicos macroscópicos en el tracto respiratorio, pero cuando son visibles, consisten predominantemente en inflamación (Jordan, 1990), hemorragias en la mucosa y una marcada congestión de la traquea. Se puede observar aerosaculitis incluso después de la infección con cepas relativamente suaves, y frecuentemente se observa el engrosamiento de los sacos aéreos asociado a infecciones bacterianas secundarias (Alexander, 2003; Jordan, 1990) pudiendo llegar incluso a contener un exudado amarillento (Carter et al, 2005).

Pollas y pavas infectadas en la etapa de postura con virus velogénicos por lo general presentan yemas de huevo en la cavidad abdominal. Los folículos ováricos se encuentran frecuentemente flácidos y degenerativos. Puede ocurrir hemorragia en los órganos del aparato reproductivo (Alexander, 2003; Comotto, 2005).

También se mencionan lesiones como petequias y equimosis en el pericardio además de esplenomegalia (Baez, 1994).

Imagen N° 11: Lesiones Macroscópicas

Los virus velogénicos viscerotrópicos ocasionan hemorragias en el tracto digestivo



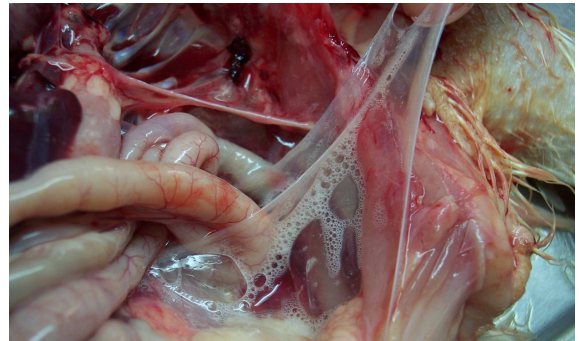
Principalmente en los agregados linfoides



Son comunes las hemorragias en el proventrículo



Algunas veces se observa aerosaculitis



Infecciones secundarias ocasionan engrosamiento de los sacos aéreos



Hemorragia y congestión en tonsilas cecales



Peritonitis líquida por huevo en la cavidad abdominal es una lesión en aves de postura



También pueden ser observados ovarios hemorrágicos



Fuente: Dra. Eliana Icochea - FMV-UNMSM

4.6.2. Lesiones Microscópicas

Se considera que las lesiones microscópicas no tienen ninguna relevancia para el diagnóstico (Alexander et al, 2004). La histopatología de las infecciones con el vENC es tan variada como los signos clínicos y las lesiones macroscópicas y se ve ampliamente afectada por los mismos parámetros. Adicionalmente a la cepa viral y al huésped, el método de infección también puede ser de mucha importancia. Por ejemplo, se demostraron cambios histopatológicos similares en traqueas de pollos infectados por cepas lentogénicas o velogénicas por inhalación de aerosol. La mayor parte de las lesiones histológicas descritas en publicaciones se refieren a los cambios relacionados a patotipos virulentos, y existen varios reportes descriptivos o revisiones bibliográficas en varios órganos durante la infección. En resumen, los mayores cambios que suceden son los siguientes (Alexander, 2003):

a. Sistema nervioso

Las lesiones observadas en el sistema nervioso central son las de una encefalitis no purulenta con degeneración neuronal, focos de células gliales, infiltración perivascular de linfocitos e hipertrofia de células endoteliales. Las lesiones son frecuentemente observadas en el cerebelo, medula y zona central del cerebro.

b. Sistema vascular

Son comúnmente encontrados congestión, edema y hemorragia asociados a vasos sanguíneos de muchos órganos. Otros cambios que pueden ser observados consisten en degeneración hidrópica de la capa media, hialinización de los capilares y arteriolas,

desarrollo de trombosis hialina en pequeños vasos y necrosis de células endoteliales de los vasos.

c. Sistema linfoide

Cambios regresivos son hallados en el sistema linfopoyético, los cuales consisten en la desaparición del tejido linfoide. Se observa hiperplasia de las células fagocíticas mononucleares en varios órganos, especialmente en el hígado, sobretodo en infecciones sub-agudas. Se encuentran lesiones necróticas a través del bazo, vacuolación focal y destrucción de linfocitos en las áreas corticales y centros germinales del bazo y timo. En la región medular de la bursa de Fabricio se observa una marcada degeneración de los linfocitos.

d. Tracto intestinal

En las infecciones de algunas formas virulentas del vENC se puede observar hemorragia y necrosis del tejido linfoide de las mucosas a través del tracto intestinal. Otras lesiones se encuentran relacionadas a cambios en el sistema vascular.

e. Tracto respiratorio

El efecto del vENC sobre las membranas del tracto respiratorio superior puede ser severo y está relacionado con el grado de afección respiratoria. Las lesiones se pueden extender a través de toda la traquea. Se pueden perder los cilios dentro de los dos días post-infección. En la mucosa del tracto respiratorio superior se puede observar congestión, edema y una densa infiltración celular por linfocitos y macrófagos, especialmente después de una exposición por aerosol. Algunas veces se observan lesiones proliferativas y exudativas en el pulmón. El proceso tiende a desaparecer rápidamente, y aves examinadas 6 días después de la infección, podrían estar libres de inflamación.

Se infectaron aves con dos cepas viscerotrópicas de los EEUU (Texas 219 y Florida Largo) en donde se observaron lesiones marcadas en los pulmones con ambas cepas, la primera produjo congestión y edema de los parabronquios y la segunda lesiones más extensas consistentes en hemorragia y eritrofagocitosis en las áreas alveolares de los parabronquios.

En pollos puede ocurrir edema, infiltración celular y un aumento en el grosor y densidad de los sacos aéreos.

f. Sistema reproductivo

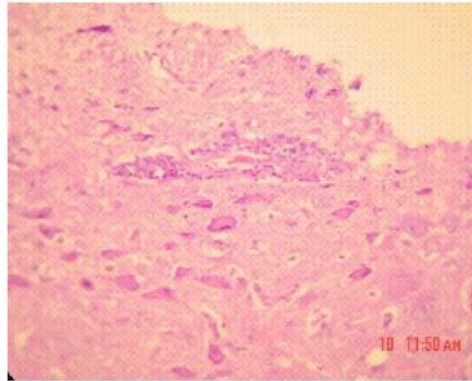
Los cambios histopatológicos en el tracto reproductivo son extremadamente variables. Algunos han reportado que el mayor daño funcional se da en el útero o en la porción formadora de cáscara en el oviducto. Los cambios en los órganos reproductivos femeninos incluyen atresia folicular con infiltración de células inflamatorias y la formación de agregados linfoides. Agregados similares están presentes en el oviducto.

g. Otros órganos

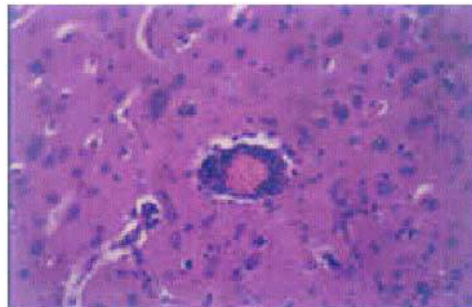
Se pueden observar pequeñas áreas focales de necrosis en el hígado y algunas veces con hemorragia en la vesícula biliar y el corazón. Se ha reportado infiltración linfocítica en el páncreas. En infecciones con virus velogénicos viscerotrópicos son comunes los cuadros de congestión, hemorragia y ulceración de la piel con presencia de petequias en las barbas y cresta. Lesiones conjuntivales pueden estar asociadas con hemorragia.

Imagen N° 12: Lesiones Microscópicas

Encefalomiелitis no purulenta



Infiltración linfocítica perivascular



Perdida ciliar en traquea



Fuente: Dra. Eliana Icochea - FMV-UNMSM

4.7. Inmunidad

4.7.1. Inmunidad Activa

a. Inmunidad Mediada por Células

La inmunidad mediada por células, en respuesta a la vacunación, se desarrolla más rápidamente que la inmunidad del tipo humoral (Fernández, 2005) y es la repuesta inicial a la infección con vENC pudiendo ser detectada tan tempranamente como 2 a 3 días post infección con cepas vacunales vivas. Se pensó que esto explicaba la temprana protección contra desafíos que ha sido registrada en aves vacunadas antes de que se pueda medir una respuesta mediada por anticuerpos. Sin embargo, un estudio posterior concluyó que la respuesta inmune mediada por células para la ENC por si sola no es protectora contra desafíos con cepas virulentas. La importancia de la inmunidad mediada por células en la protección conferida por vacunas por lo tanto, no es clara, y una fuerte respuesta secundaria a desafíos, similar a la respuesta mediada por anticuerpos, es poco probable (Alexander, 2003). Ha sido demostrado que no existe correlación entre la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral y que no existe correlación entre la inmunidad mediada por células y la protección de las aves. También se ha demostrado que la respuesta de la inmunidad mediada por células es la responsable del efecto protector de las vacunas administradas por aspersión en parvadas con niveles elevados de anticuerpos maternos (Fernández, 2005).

El sistema de interferón (IFN) es la primera línea de defensa del huésped contra las infecciones virales, los interferones inducen un estado antiviral que puede inhibir la replicación viral y controlar la diseminación del virus. Se ha documentado que diferentes cepas del vENC tienen diferentes habilidades para inducir la producción de IFN y para contrarrestar los efectos del IFN (Huang et al, 2003).

Se ha demostrado una respuesta celular tan tempranamente como dos días post infección en la tráquea. La mayoría de las células infiltradas en la mucosa pertenecían al linaje de células T. El número de células CD8+ excedió a las células CD4+. En la glándula de Harder el número de células CD3+ se incrementó considerablemente. También se incrementaron las células B y células no linfoides, especialmente células dendríticas foliculares y macrófagos. Debido a que muchas células T fueron detectadas localmente en ambos órganos, se sugiere que estas células podrían jugar un rol en la eliminación del vENC en el lugar de infección (Al-Garib et al, 2005).

b. Inmunidad Humoral

Los anticuerpos circulantes, capaces de proteger al huésped, pueden ser medidos en pruebas de virus neutralización (VN), inhibición de la hemoaglutinación (HI) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) (Villegas et al, 1995; Hoerr, 2004). La respuesta a VN aparece paralelamente con la respuesta a HI, la HI es frecuentemente utilizada para evaluar la respuesta protectora, sobretodo, después de la vacunación. Los antígenos más importantes del virus son las glicoproteínas de la superficie HN y F (King, 1999; Villegas et al, 1995). Los anticuerpos dirigidos contra cualquiera de estas dos superficies funcionales pueden neutralizar

al vENC. De hecho, MABs específicos para los epítomos en el polipéptido F han demostrado inducir mayor neutralización que aquellos dirigidos contra HN en pruebas in vitro e in vivo. Por lo tanto, la exitosa confiabilidad en la prueba simple de HI para medir la protección hasta ahora podría haber sido fortuita (Alexander, 2003).

Cuando los pollos sobreviven a la infección de la ENC el tiempo suficiente, los anticuerpos son detectables usualmente en el suero dentro de 6 a 10 días post-infección. Los niveles dependerán ampliamente en la cepa infectiva, pero por lo general, la respuesta pico se da a las 3-4 semanas. El descenso en los títulos de anticuerpos varía según el título alcanzado, pero es mucho más lento que su desarrollo. Se pueden seguir midiendo anticuerpos por HI hasta un año después en aves que se recuperaron de la infección con virus mesogénicos o después de una serie de inmunizaciones. La re-infección o la inmunización algunas semanas después de que el título empieza a decrecer produce una respuesta secundaria (Alexander, 2003; Comotto, 2000).

La principal función de la inmunidad humoral radica en disminuir la velocidad de diseminación del virus a diferentes tejidos (Fernández, 2005).

Se ha demostrado que pollos vacunados con depleción de linfocitos B pueden ser resistentes a la infección (Hoerr, 2004; Seal et al, 2000).

c. Inmunidad Local

Los anticuerpos aparecen en secreciones del tracto respiratorio superior y del tracto digestivo de pollos más o menos al mismo tiempo en que los primeros anticuerpos humorales pueden ser detectados (Alexander, 2003). En la parte superior del tracto respiratorio, las inmunoglobulinas (Ig) parecen ser mayormente IgA con algo de IgG (Alexander, 2003), sin embargo también puede ser detectada la IgM en las secreciones respiratorias. Los anticuerpos inhiben la replicación viral en la superficie de la mucosa respiratoria (Hoerr, 2004). La IgG puede ser encontrada en exudados traqueales debido al trasudado de suero como resultado del daño causado por el virus en la tráquea (Villegas et al, 1995). Excreciones similares ocurren en la glándula de Harder después de la infección ocular, pero no de la parenteral. Se demostró la efectividad de la inmunidad local cuando se encontró que aves pueden ser susceptibles a la infección por una vía, pero estar protegidas en otras. La función exacta de la inmunidad local en la protección no está muy clara, aunque se ha propuesto que tiene un rol en la protección del tracto respiratorio independientemente de la inmunidad humoral. La vacunación por gota ocular con la cepa Hitchner B1 resulta en la replicación viral en la glándula de Harder, lo cual puede ser prevenido por la presencia de IgG maternas en el fluido lacrimal. La replicación del virus en la glándula de Harder resulta en la producción de IgG, IgA e IgM lacrimales. La glándula de Harder es el principal sitio para las células formadoras de IgA en el pollo. Se ha hecho hincapié en que la IgM puede ser la clase de anticuerpo involucrada más activamente en la limpieza del virus en las infecciones conjuntivales (Comotto, 2000; Alexander, 2003). La

presencia de Igs se correlaciona con la acumulación linfocítica en la tráquea y el incremento de células plasmáticas en la glándula de Harder (Hoerr, 2004).

La caracterización de la población de leucocitos y sus interacciones con las partes antigénicas del vENC es esencial para entender la importancia de la inmunidad local celular y por lo tanto la eficacia de las vacunas (Al-Garib et al, 2005).

4.7.2. Inmunidad Pasiva

Gallinas con anticuerpos para la ENC le pasarán éstos a la progenie a través de la yema del huevo (saco vitelino). Los niveles de anticuerpos en pollitos BB de un día de edad estarán directamente relacionados con los títulos en los progenitores. Se ha estimado por la prueba de HI que toma cerca de 4.5 días el descenso a la mitad de los títulos de anticuerpos derivados de la madre. La inmunidad maternal es protectora y, por lo tanto, debe ser tomada en cuenta para la primovacuna de los pollitos (Alexander, 2003; Villegas et al, 1995).

El pollito incorpora las inmunoglobulinas a sus sistemas al momento de nacer, por ejemplo, la yema contiene IgG que resultan ser los anticuerpos humorales y la albúmina contiene principalmente IgA, la cual pasa a cubrir la superficie de las membranas (Fernández, 2005).

4.7.3. Inmunosupresión

La supresión de la respuesta inmune tiene efectos importantes tanto en la patogenicidad del vENC infeccioso como en los niveles protectivos logrados por la vacuna. Bajo condiciones naturales, la inmunosupresión puede ocurrir a causa de la infección con otros virus como el de Gumboro. La inmunodeficiencia subsecuente puede resultar en la presentación de una enfermedad más severa causada por algunas cepas del vENC y en una falla en la respuesta adecuada a la vacuna. La inmunosupresión a causa de la Anemia Infecciosa en pollos también ha sido implicada en la falla de una adecuada respuesta a la vacuna secundaria con vacuna inactivada contra la ENC (Alexander, 2003), al igual que la presencia de micotoxinas. Si la respuesta inmune se encontrara comprometida, se podrían esperar reacciones postvacunales más severas (Comotto, 2000).

Se ha demostrado que la eliminación de la cepa viral vacunal La Sota se ve prolongada a causa de factores inmunosupresores como la presencia de la Enfermedad de Gumboro (IBD) y aflatoxina B₁ (Otim et al, 2005).

Se han evaluado los beneficios de la utilización de un estimulante inmunológico (Levamisol) y un producto antiestrés comercial a base de ácido ascórbico, ácido acetoxibenzoico, cloruro de sodio y cloruro de potasio; ambos productos incrementaron la actividad fagocítica de los heterófilos in vitro y presentaron mayor diámetro folicular en la bolsa de Fabricio. Diversos estudios han encontrado que el uso de Levamisol vía agua de bebida favorece la respuesta vacunal contra diferentes agentes como el vENC. Si bien no se presentó efecto alguno sobre el nivel de anticuerpos promedio, los animales tratados y vacunados no presentaron un efecto tan negativo como en los del grupo control (vacunados y sin tratamiento), probablemente por la

acción inmunomoduladora y antipirética de los componentes, por lo que se concluye que el tratamiento preventivo con estos productos logra mejores parámetros productivos al manejo por vacunación (Rubio García et al, 2002).

4.8. Importancia en Salud Pública

Además de su contribución a la malnutrición, el vENC es un reconocido patógeno humano por derecho propio. Existen reportes de enfermedad aunque en su mayoría son anecdóticos, sin duda el signo clínico mayormente descrito en las infecciones humanas es la infección ocular, la cual usualmente consiste en enrojecimiento unilateral o bilateral, lagrimeo excesivo, edema de los párpados, conjuntivitis y hemorragia subconjuntival. Las infecciones por lo general son transitorias y la cornea no se ve afectada. Han habido también reportes menos sustentados en donde una infección más generalizada puede ocurrir pudiéndose observar escalofríos, dolor de cabeza y fiebre, con o sin conjuntivitis (Alexander, 2003).

La evidencia muestra que ambas cepas (vacunales o de campo) pueden infectar y ocasionar signos clínicos en humanos. Las infecciones humanas con vENC han sido por lo general resultado del contacto directo con el virus, por ejemplo, por salpicaduras de líquido alantoideo infectivo en los ojos en accidentes de laboratorio, por el sobado de ojos con las manos con material infectivo, por la contaminación por el manipuleo de aves infectadas o sus carcasas, o la contaminación del personal de vacunación, especialmente cuando las vacunas son aplicadas por aerosol. Dichas infecciones pueden ser evitadas con medidas higiénicas básicas, adecuada vestimenta y protección ocular. El contacto casual con aves infectadas representa un bajo riesgo para la infección humana. No existen reportes de transmisión entre humanos (Alexander, 2003).

V. Diagnóstico

Los objetivos en el diagnóstico de infecciones ocasionadas por vENC son el llegar a una decisión sobre imponer medidas de control y el obtener evidencia que apoye las investigaciones epidemiológicas. Ninguno de los signos clínicos o lesiones del vENC pueden ser considerados patognomónicos, y la amplia variación de la enfermedad según la cepa viral, el huésped afectado y otros factores, nos sugieren que estos parámetros se pueden tomar, a lo mucho, como sugerencia de infección con el vENC. De manera similar, la mera demostración de la infección sin la definición del tipo de virus infectivo, debido a la presencia de cepas lentogénicas en aves en la mayoría de países y el uso casi universal de las vacunas vivas, es poco adecuada para implantar medidas de control. Adicionalmente, el vENC puede causar epizootias tan devastadoras y puede tener efectos a tan largo alcance en el comercio de productos avícolas que, por lo general, las medidas de control se definen a nivel nacional o internacional (Alexander, 2003).

5.1. Aislamiento e Identificación del Agente Causal

5.1.1. Detección Directa de los Antígenos Virales

Técnicas inmunohistológicas ofrecen un método rápido para la demostración específica de la presencia de antígenos virales en órganos y tejidos. Técnicas de inmunofluorescencia para secciones delgadas de traquea o frotis celular y una técnica de inmunoperoxidasa en secciones delgadas han sido descritas y utilizadas en infecciones por vENC (Alexander, 2003).

5.1.2. Aislamiento Viral del Virus de la Enfermedad de Newcastle

Hasta el momento el aislamiento viral es el único método inequívoco para el diagnóstico de la ENC, el cual además permite la caracterización de la cepa infectiva (Alexander, 2003). El aislamiento y la caracterización de cepas sospechosas de ser patogénicas debe realizarse en laboratorios con seguridad especial contra los virus (OIE, 2004). En los EEUU los virus virulentos sólo pueden ser propagados en laboratorios con nivel de bioseguridad 3 (BSL-3), restricciones similares se aplican en muchos otros países (Alexander, 1998).

a. Sistemas de Cultivo

Los virus virulentos de la ENC pueden ser propagados en muchos cultivos celulares, y los virus de baja virulencia pueden ser llevados a replicar en algunos de ellos. Es posible utilizar cultivos celulares primarios o incluso líneas celulares para el aislamiento de rutina del vENC. Los huevos embrionados de pollo, sin embargo, representan un vehículo extremadamente susceptible y conveniente para la propagación del vENC y es utilizado universalmente para el diagnóstico (Alexander, 2003). Sin embargo se ha observado que existen aislamientos ocasionales para los cuales el cultivo de células epiteliales de embriones de pollo, tanto de hígado como de riñón, constituye un mejor sustrato en el aislamiento primario del virus en comparación con los huevos de embriones de pollo (King, 2002).

Los huevos embrionados de pollo deben ser obtenidos de un lote SPF (Specific Pathogen Free) e incubados por 9-10 días a 37°C antes de su uso. Si no se pudieran obtener huevos SPF, se pueden utilizar huevos provenientes de un lote libre de anticuerpos contra vENC (Alexander, 2003). El utilizar huevos de lotes con anticuerpos positivos al vENC, reducirá la habilidad del virus para crecer y la posibilidad de lograr el aislamiento viral (Alexander, 1989), tales huevos deben ser evitados para el diagnóstico de la enfermedad (Alexander, 1998).

b. Muestras

Los dos principales lugares de replicación del virus en aves infectadas parecen ser los tractos respiratorio y digestivo, por tanto, las muestras remitidas deben incluir, contenido intestinal, hisopado cloacal, traquea, hisopados traqueales según las circunstancias (Alexander, 2003) independientemente de los signos clínicos o las lesiones postmortem (Alexander, 1998). Muestras tomadas de aves muertas deben reflejar los signos clínicos previos a la muerte y órganos evidentemente afectados (Alexander, 2003; Jordan, 1990). El vENC virulento puede ser aislado comúnmente de pulmones, bazo, hígado, corazón, cerebro y riñón (Alexander, 1998; OIE, 2004).

Las muestras deben colocarse en una solución salina isotónica tamponada con fosfato que contenga antibióticos a un pH entre 7.0 y 7.4 (el pH debe ser medido después de la adición del antibiótico) y donde se asegure una total inmersión de la muestra. Los antibióticos utilizados y sus concentraciones son variables según las condiciones locales y la disponibilidad. Se deben utilizar concentraciones muy altas de antibióticos para las muestras fecales; las concentraciones

y antibióticos recomendados son: 10,000 UI/ml. de penicilina, 10 mg/ml. de estreptomicina, 0.25 mg/ml. de gentamicina y 5,000 UI de nistatina. Estas concentraciones pueden reducirse hasta la quinta parte para tejidos e hisopados traqueales. Si se desea controlar clamidia se debe adicionar 0.05 – 0.1 mg/ml. de oxitetraciclina (Alexander, 1989; Alexander, 1998; OIE, 2004). Las heces y tejidos deben ser triturados y suspendidos al 10-20% p/v. Las muestras pueden ser almacenadas a 4°C si van a ser procesadas en las siguientes 48 horas o congeladas a -20°C hasta el momento del aislamiento (Alexander et al, 2003) y deben permanecer a temperatura ambiente por 2 horas antes de su inoculación (Alexander, 1998).

Las probabilidades de un aislamiento exitoso incrementan con el procesamiento rápido de las muestras (Alexander, 1998). El vENC es relativamente estable por largos periodos de tiempo en tejidos no putrefactos donde las temperaturas ambientales son bajas. Sin embargo se considera que el transporte de muestras en estado congelado o enfriado es muy importante para el aislamiento viral. Se ha sugerido también que la médula ósea podría ser una muestra útil en países donde el transporte es lento, las temperaturas son altas y no hay refrigeración disponible, ya que se pudo aislar el virus de estas muestras luego de varios días a 30°C (Alexander, 2003). La mayoría de los vENC sobreviven a un ciclo de congelamiento-descongelamiento con poca pérdida de la infectividad. El colocar las muestras en un medio antibiótico para su transporte debe ser realizado en adición al enfriamiento y no como una alternativa a la misma (Alexander, 1998).

Se ha evaluado también muestras de aire ambiental como método de muestreo para la detección de vENC circulantes. Por medio de RT-PCR se detectaron virus de muestras de aire colectadas con un muestreador tipo ciclón de pared mojada ubicado a dos metros del galpón, lo que podría significar a futuro la utilización de éste método ya que resulta ser un método eficiente y costo efectivo (Hietala et al, 2005).

La manipulación y transporte de vENC de alta patogenicidad representa un riesgo para la bioseguridad, sin embargo, el traslado de virus hacia laboratorios con la tecnología requerida para la patotipificación molecular o biológica, es una necesidad. Durante los últimos años se ha evaluado la utilización de tarjetas de papel filtro Flinders Technology Associates (tarjetas FTA) para la inactivación y traslado de patógenos aviares, incluido el vENC. Las tarjetas FTA están constituidas de una membrana de celulosa que contiene químicos liofilizados capaces de inactivar un amplio rango de microorganismos, preservando sus ácidos nucleicos. Las tarjetas FTA permitieron la identificación mediante RT-PCR del vENC en fluido alantoideo e improntas de tráquea, pulmón, tonsila cecal y heces, incluso 14 días después de tomada la muestra, la secuenciación de los nucleótidos amplificados a partir del virus presente en las tarjetas permite predecir la secuencia de aminoácidos del lugar de división de la proteína F y la virulencia del aislamiento. Estas tarjetas lograron inactivar completamente el virus, lo cual garantiza un muestreo y transporte sin riesgos (Perozo et al, 2005).

c. Método de Aislamiento

Idealmente, cada muestra debe ser tratada individualmente. Es común hacer pools de muestras de órganos y tejidos, sin embargo se recomienda mantener separadas las muestras traqueales y fecales, tanto entre ellas, como de muestras de órganos y tejidos. En el caso de aves que mostraron signos neurológicos antes de morir, sobretodo en el caso de investigar infecciones en palomas, se recomienda tratar las muestras de cerebro separadas de otros órganos y tejidos (Alexander, 1998).

Las suspensiones se mantienen a temperatura ambiente por 1 a 2 horas y luego son centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a una temperatura no mayor de 25°C (OIE, 2004). Cada uno de los 5 huevos embrionados (8 a 10 días) (Jordan, 1990) debe ser inoculado con 0.2 ml. del fluido sobrenadante en la cavidad alantoidea. Los huevos son luego colocados a 37°C y son examinados regularmente por un período de 4 a 7 días (Alexander, 2003).

Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos, y todos los huevos que permanezcan hasta el final del período de incubación deben ser enfriados a 4°C (OIE, 2004), y el fluido amniótico/alantoideo debe ser cultivado. La presencia del virus puede ser detectada por una prueba de HA (Alexander, 2003). Idealmente, los fluidos que no hemaglutinan (negativos) deben ser pasajeados sin dilución alguna al menos una vez mas (Alexander, 1998). La hemoaglutinación puede ser ocasionada por bacterias, y una posible contaminación debe ser evaluada por medio de un cultivo. Si hubiera presencia de bacterias, el fluido contaminado debe ser pasado a través de un filtro de membrana de 450 nm o ser centrifugado previamente al repase en huevos (Alexander, 2003; Alexander, 1998; Jordan, 1990).

El diagnóstico se basa en la inhibición de la hemoaglutinación por sueros anti-vENC específicos. Esto comprueba la infección del ave por el virus, pero no indica si se trata de un virus patogénico o una cepa avirulenta (Alexander et al, 2004).

5.2. Caracterización Viral

La amplia diseminación de las cepas lentogénicas en aves silvestres y el uso de tales virus como vacunas vivas hacen que el aislamiento del vENC pocas veces sea suficiente para confirmar el diagnóstico de la enfermedad. Para dicha confirmación y para lograr los requerimientos establecidos obligatoriamente, es necesario hacer adicionalmente la caracterización viral, ya sea por pruebas de patogenicidad o por secuenciación de nucleótidos (Alexander, 2003; Jordan, 1990).

a. Pruebas de Patogenicidad in vivo

La importancia y el impacto de un aislamiento del vENC estarán directamente relacionados con la virulencia de dicho aislamiento. Debido a que la enfermedad de campo podría ser una medida poco confiable de la verdadera virulencia del virus, es necesario realizar la evaluación de la patogenicidad por medios de laboratorio. En la actualidad se utilizan 4 pruebas in vivo para este propósito (Alexander, 1998; Alexander, 2003; Jordan, 1990; King, 1999; OIE, 2004):

1. Tiempo letal medio en huevos (MDT - Mean Death Time)

Para esta prueba se deben realizar una serie de diluciones (10^{-6} a 10^{-9}) del virus (fluido alantoideo infectivo fresco y estéril) en solución salina isotónica y 0.1 ml. de cada dilución se inocula dentro de la cavidad alantoidea de cada uno de al menos cinco huevos SPF embrionados de 9 a 10 días. Aproximadamente 8 horas después, se inoculan 5 huevos más con cada una de las diluciones, que fueron previamente almacenadas a 4°C. Los huevos se incuban a 37°C y son revisados a contraluz dos veces al día (temprano en la mañana y por la tarde) por 7 días. El momento en el cual cada embrión es observado muerto se registra. La dosis letal mínima es la dilución más alta en la cual todos los embriones mueren. Según el tiempo promedio en horas se les clasifica como: Velogénicas: < 60 horas; Mesogénicas: 60-90 horas; Lentogénicas: > 90 horas.

2. Índice de Patogenicidad Intracerebral (ICPI – Intracerebral Pathogenicity Index)

El ICPI se determina por inoculación de 0.05 ml de una dilución de 1:10 de fluido alantoideo infectivo libre de bacterias con título HA $>1/16$ ($>2^4$) en solución salina isotónica (no deben haber antibióticos presentes) dentro del cerebro de cada uno de los 10 pollitos SPF de un día de edad (24-40 horas de edad). Cada ave es examinada a intervalos de 24 horas por 8 días y se les califica en cada observación: 0 si es normal, 1 si está enfermo y 2 si muere. Los individuos muertos deben ser calificados como 2 en cada una de las observaciones diarias después de su muerte. El índice es valor promedio de cada ave por observación al final del periodo de los 8 días. Los virus más virulentos dan valores de ICPI cercanos al 2.0, mientras que las cepas lentogénicas dan valores cercanos al 0.0.

3. Índice de Patogenicidad Endovenosa (IVPI – Intravenous Pathogenicity Index)

El IVPI se determina por inoculación de cada uno de 10 pollos SPF de 6 semanas de edad con 0.1 ml de una dilución de 1:10 en solución salina isotónica estéril de fluido alantoideo infectivo fresco con título HA $>1/16$ ($>2^4$) y libre de bacterias por vía endovenosa. Cada ave es examinada a intervalos de 24 horas por 10 días y se les califica: 0 si es normal, 1 si está enfermo, 2 si está paralizado y 3 si muere. Los individuos muertos deben ser calificados como 3 en cada una de las observaciones diarias después de su muerte. El índice es valor promedio de cada ave por observación al final del periodo de los 10 días. Los virus más virulentos dan valores de IVPI cercanos al 3.0, mientras que las cepas lentogénicas y la mayoría de las mesogénicas dan valores de 0.

4. Prueba de Patogenicidad por Inoculación Intracloual

La virulencia y el tropismo se evalúan por el hisopado cloacal o conjuntival de 4 aves de 6 a 8 semanas alojadas individualmente con una dilución de 1:10 de fluido alantoideo infectivo. Las aves son observadas por 10 días. Si las aves desarrollan signos clínicos y mueren, el virus se clasifica como velogénico. El tropismo se establece

por las lesiones en la evaluación postmortem. Las lesiones se categorizan entre +4 y +1, en donde: +4= edema de la cabeza y cuello, hemorragia en la traquea, hemorragia y necrosis o ulceraciones a través del tracto digestivo; +3= lesiones en el tracto respiratorio y digestivo; +2 = lesiones marcadas en la cloaca y lesiones menos severas en el tracto respiratorio y digestivo; +1= lesiones leves pero discernibles en el tracto respiratorio y digestivo. Los virus son considerados viscerotrópicos si una de las aves muestra lesiones del tipo +4 o al menos dos de las aves muestran lesiones de los tipos +2 o +3.

De todas la pruebas de patotipificación, el método de ICPI es considerado como el mejor para predecir la virulencia o potencial virulencia de las cepas del vENC debido a que permite la diferenciación de virus lentogénicos de los virus mesogénicos y velogénicos, por esta razón el ICPI tiene un rol más importante en la diferenciación de cepas de baja y alta virulencia en la actual definición de ENC por la OIE (King, 1999). Además existen virus capaces de producir una severa enfermedad y presentar valores del IVPI de 0 (OIE, 2004).

Aunque estas pruebas de patogenicidad han demostrado ser invalorable para distinguir entre virus vacunales, enzoóticos y epizooticos durante los brotes, existen algunas desventajas en las pruebas y dificultad en la interpretación de los resultados. Se ha reportado que en 10 aislamientos de vENC realizados en palomas mostraron valores entre 1.2 y 1.45 para el ICPI y el rango de valores para el IVPI oscilaba entre 0 y 1.3, lo que sugería que los virus eran al menos mesogénicos, sin embargo, el valor más bajo para el MDT fue a las 98 horas, lo cual es una característica de los virus lentogénicos (Alexander, 2003). En otro estudio, 12 cepas aisladas de palomas (con sintomatología nerviosa y alta mortalidad) identificadas por MABs como APMV-1 fueron evaluadas por su patogenicidad en pollos susceptibles y demostraron no ser patogénicas (MDT entre 71 y 121 horas), sin embargo mostraban dos atributos similares a los de virus virulentos: ICPI entre 0.8 - 1.15 y la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el lugar de división de la proteína F (Panigrahy et al, 2002). Adicionalmente, se ha demostrado que aislamientos del vENC de palomas (PPMV-1) incrementaban ambos índices (ICPI e IVPI) después del pasaje a través de pollos o huevos embrionados de pollo (King et al, 2002). Esto sugiere que los aislamientos de otras aves distintas a las aves de corral podrían no mostrar su potencial de virulencia para los pollos en las pruebas convencionales de patogenicidad (Alexander, 2003). Los brotes en pollos con la variante de palomas y en pavos con el virus de los cormoranes son ejemplos de las dificultades presentadas recientemente con virus que actúan más como mesogénicos que como velogénicos. Pruebas para diferenciar virus lentogénicos de mesogénicos y velogénicos, en lugar de diferenciar velogénicos de los lentogénicos y mesogénicos serán más efectivas en identificar los virus que son potencialmente virulentos para los pollos (King, 1999).

Más recientemente, una cepa clasificada como velogénica neurotrópica debido a sus índices de patogenicidad (ICPI: 1.93 y IVPI: 2.64) al ser analizada por medio de RT-PCR demostró tener una secuencia de aminoácidos típica de una cepa de baja virulencia. Pruebas adicionales

han revelado que dicha cepa se trata de una población con componentes mixtos de alta y baja virulencia y demuestra el riesgo potencial de la clasificación viral basándose en una sola prueba (King et al, 2005)

Cuadro N° 5: Ejemplos de los índices de patogenicidad en distintas cepas del vENC

Cepa Viral	Patotipo	ICPI	IVPI	MDT
Ulster 2C	Entérica asintomática	0.0	0.0	> 150
Queensland V4	Entérica asintomática	0.0	0.0	> 150
Hitchner B1	Lentogénica	0.2	0.0	120
F	Lentogénica	0.25	0.0	119
La Sota	Lentogénica	0.4	0.0	103
H	Mesogénica	1.2	0.0	48
Mukteswar	Mesogénica	1.4	0.0	46
Roakin	Mesogénica	1.45	0.0	68
Beaudette C	Mesogénica	1.6	1.45	62
Texas GB	Velogénica	1.75	2.7	55
NY parrot 70181	Velogénica	1.8	2.6	51
Italien	Velogénica	1.85	2.8	50
Milano	Velogénica	1.9	2.8	50
Herts 33/56	Velogénica	2.0	2.7	48

Fuente: Alexander, 2003

b. Pruebas de Patogenicidad in vitro

Sólo los vENC que poseen aminoácidos básicos adicionales en el lugar de división de la proteína de fusión se vuelven infecciosos por proteasas diferentes a la tripsina. Se sugirió que la habilidad de los aislamientos del vENC a formar placas en los cultivos celulares en la ausencia de tripsina representa una forma in vitro simple para la detección de virus virulentos (Alexander, 2003).

Como ya se discutió anteriormente, un mayor entendimiento de las bases moleculares para la patogénesis ha sido obtenida en los últimos años, y las definiciones internacionales ahora permiten la detección de aminoácidos básicos múltiples en el lugar de división F0 para ser utilizados dentro de las pruebas in vitro para confirmar la virulencia de los vENC (OIE, 2000).

c. Perfil de Propiedades Virales

Los aislamientos de vENC muestran una marcada variación en las propiedades biológicas y bioquímicas, y algunos investigadores utilizaron estas propiedades para desarrollar distintos perfiles que permitieron el agrupamiento de virus para propósitos de diagnóstico. Bajo circunstancias específicas, una sola propiedad del virus podría ser suficiente para distinguir entre aislamientos virulentos y no virulentos y ser empleados útilmente en el diagnóstico (Alexander, 2003).

d. Anticuerpos Monoclonales

Adicionalmente a su uso en el diagnóstico de rutina, un panel de MABs puede ser utilizado para caracterizar y agrupar aislamientos mediante el establecimiento de perfiles. Tal tipificación

en bases antigénicas representa una poderosa herramienta para los diagnosticadores y epizootólogos, permitiendo un rápido agrupamiento y diferenciación de los aislamientos del vENC (Alexander, 2003, OIE, 2004).

Evaluaciones epidemiológicas utilizando MABs para detectar diferencias antigénicas y el análisis de secuencia de nucleótidos para detectar diferencias en las secuencias del genoma entre virus han mejorado ampliamente la capacidad de identificar fuentes potenciales de nuevas infecciones (King, 1999).

La forma más comprensible de uso de MABs para la caracterización y clasificación de cepas es en donde se agrupan las cepas o aislamientos del vENC en base a su habilidad para reaccionar con los distintos MABs. Virus dentro del mismo grupo de MABs comparten propiedades biológicas y epidemiológicas. Se han señalado las similitudes que existen entre grupos virales formados en bases genéticas y grupos formados en base a la similitud antigénica detectada por MABs (Alexander, 2003). Se examinó la habilidad de más de 1,500 cepas del vENC para reaccionar con paneles de MABs, inicialmente consistieron de 9 para ser extendidos luego a 26, se colocaron a las cepas y a los aislamientos del vENC dentro de grupos según su habilidad para reaccionar con los diferentes MABs (Alexander, 1998). Utilizando el panel de 9 MABs se observaron 14 patrones diferentes y los virus agrupados dentro del mismo patrón mostraron relaciones entre ellos, ya fueran biológicas, temporales o geográficas o más de una de estas. La tendencia estuvo marcada a agruparlos según la patogenicidad mostrada en pollos. La extensión del panel a 26 MABs produjo 39 diferentes patrones, aunque algunos de ellos fueron observados para una sola cepa (Alexander et al, 1997).

Cuadro N° 6: Agrupamiento de aislamientos de vENC utilizando anticuerpos monoclonales de ratón y algunas características de los virus dentro de los grupos

Grupo	Características de los virus analizados			Ejemplo
	Tipo de virus	Huésped principal	Otras características	
A	VVND	Aves comerciales	Panzootia de 1970	NY parrot 70181 Essex '70
B	VVND	Aves comerciales	Vacunas mesogénicas	Hertz '33 Mukteswar
C1	Velogénica	Aves comerciales	Psitácidas	Aislamientos recientes de Europa y Medio Oriente MB20
C2	Lentogénica	Aves acuáticas		
D	Varios	Pollo	Aislamientos de EEUU	Texas GB, Roakin, Komarov
E	Lentogénica	Aves acuáticas	Vacunas	Hitchner B1 La Sota
F	Lentogénica	Pollo	Utilizados como vacunas	Cepa F
G	Lentogénica	Aves acuáticas	Algunas usados como vacunas	Ulster 2C V4
H	Lentogénica	Aves acuáticas		MC110
L	Lentogénica	Aves acuáticas		Loon/USA
P	PPMV-1	Palomas	Panzootia en palomas	617/83

Los grupos están definidos por la habilidad de los virus para reaccionar con 10 anticuerpos monoclonales seleccionados, cada grupo tiene un perfil único.

Fuente: Alexander, 1998

5.3. Serología

Los valores de cualquier método serológico en el diagnóstico de la ENC son claramente dependientes del status inmune esperado de las aves involucradas y por lo tanto es complicado por el uso de vacunas a nivel mundial. En aves no vacunadas, una serología positiva y la presencia de signos clínicos puede ser considerada como fuerte evidencia diagnóstica (Jordan, 1990) sin embargo, se debe considerar la posibilidad de una reacción cruzada (Alexander, 1998). En otros casos, la serología de parvadas vacunadas puede ser un fuerte indicativo de una respuesta al desafío, pero la interpretación de títulos elevados necesita mucho cuidado y no puede ser tomada como evidencia inequívoca (Jordan, 1990).

La presencia de anticuerpos específicos para la ENC en el suero de un ave da muy poca información sobre la cepa infectiva del vENC, por lo tanto, tiene muy poco valor diagnóstico. Sin embargo, en determinadas circunstancias el demostrar que la infección se ha dado a cabo es suficiente para el diagnóstico. La serología post-vacunal puede ser utilizada para confirmar la aplicación exitosa y uniforme de la vacuna y la adecuada respuesta inmune por parte del ave (Alexander, 2003; Comotto, 2000).

Aunque se han realizado muchos trabajos para determinar el resultado ante la infección con virus virulentos de la ENC a distintos niveles de inmunidad, se debe tener mucho cuidado en hacer dichas determinaciones debido a los efectos que otros factores podrían tener (Alexander, 1998).

Cuadro N° 7: Interpretación de resultados según los títulos por la prueba HI según programa de vacunación

Programa de Vacunación	Títulos Individuales	Resultado de la Prueba HI
Ninguno	1:2	Negativo
	1:4	Sospechoso
	≥1:8	Positivo
1 vacuna con virus vivo	≤1:8	Negativo
	1:16	Sospechoso
	≥1:32	Positivo
2 a 3 vacunas con virus vivo	≤1:16	Negativo
	1:32	Sospechoso
	≥1:64	Positivo
4 a 5 vacunas von virus vivo	≤1:32	Negativo
	1:64	Sospechoso
	≥1:128	Positivo
1 vacuna con virus vivo más 1 vacuna con virus inactivado	≤1:16	Negativo
	1:32	Sospechoso
	≥1:64	Positivo
1 a 2 vacunas con virus vivo más 1 a 3 vacunas con virus inactivado	≤1:32	Negativo
	1:64	Sospechoso
	≥1:128	Positivo
3 a 5 vacunas con virus vivo más 1 a 2 vacunas con virus inactivado	≤1:128	Negativo
	1:256	Sospechoso
	≥1:512	Positivo

Interpretado por un panel de expertos conformado por: Dra. Eliana Icochea D'Arrigo (Laboratorio de Patología Aviar de la FMV-UNMSM. Lima – Perú); Dr. Arturo Salas Serrano (Laboratorio Intevet. Lima – Perú); Dra. Sonia Cortez de Jäckel (Laboratorio de Microbiología y Serología Clínica de Aves. Delbrück-Alemania); Dra. Mónica Alba Chinchá (Laboratorio de Patología Aviar de la FMV-UNMSM. Lima – Perú).

Fuente: Ferrer, 2005

Si se utilizan antígenos con 4 unidades hemaglutinantes (HAU), un título HI de $\log_2 3$ (1:8) es indicativo de protección y un título de $\log_2 6$ (1:64) o mayor sugiere una infección reciente. Si no se ha realizado la vacunación de las aves, el diagnóstico de la infección puede ser hecho en base a estos resultados, aunque no se puede determinar exactamente cuando se dio a cabo la infección. Muestras seriadas tomadas a diferentes tiempos pueden indicar, si el título va en aumento, que la infección ha ocurrido recientemente o si esta declinando que la infección ocurrió un tiempo atrás (Alexander et al, 2004). Se pueden considerar positivos los títulos HI si ocurre inhibición de los sueros en diluciones de 1:16 (2^4) o mayores con antígenos con 4 HAU. Algunos laboratorios prefieren utilizar 8 HAU en las pruebas HI. Mientras esto es permisible, definitivamente afecta a la interpretación de los resultados ya que un título positivo en este caso sería el de 1:8 (2^3) o mayor. En todas las pruebas se debe incluir la titulación del antígeno para verificar el número de HAU utilizado (OIE, 2004).

En general, en la prueba de HI, los títulos de anticuerpos de una infección natural declinan después de 3 a 4 meses, y no son detectados después de 8 a 12 meses; mientras, los títulos de anticuerpos inducidos por vacunación perduran de 2 a 12 meses, dependiendo de la cepa utilizada y la ruta de administración de la vacuna (Beard et al, 1984).

En aves de larga vida, se recomienda mantener los registros de cada lote para establecer los niveles de anticuerpos normales para cada lote de aves. Cuando estos niveles se incrementan considerablemente sin encontrar una causa aparente, entonces se puede pensar en la presencia de virus de campo responsables por el aumento en los niveles de anticuerpos. Si este aumento se acompaña de bajas en la producción o presencia de anomalías en los huevos, en algunos casos se podría establecer un diagnóstico de la ENC (Villegas et al, 1995).

Títulos de ELISA mayores a 5,000 o promedios geométricos HI mayores a 15 podrían indicar la presencia de cepas de campo del vENC. En algunas ocasiones, si los pollos se infectan con virus de campo cerca a la 4ta semana, los títulos de ELISA a la 6ta semana son normales, sin revelar el hecho que las aves han estado infectadas. Sin embargo, en estos casos, los títulos obtenidos en la prueba HI sí muestran un aumento considerable. Por lo tanto, en casos como éste, es conveniente disponer de ambos sistemas serológicos para poder establecer el estado inmunológico del lote de pollos (Villegas et al, 1995).

5.3.1. Pruebas Serológicas para Anticuerpos de la Enfermedad de Newcastle

Anticuerpos para el vENC pueden ser detectados en sueros aviares por medio de una variedad de pruebas incluyendo inmunodifusión radial, hemólisis radial, precipitación en agar gel, Virus neutralización en embriones de pollo y neutralización en placa. Convencionalmente, los anticuerpos contra el vENC y otros paramixovirus han sido detectados y cuantificados por pruebas HI. Se han descrito muchos métodos para HA y HI (Alexander, 2003). La HI es la prueba más ampliamente utilizada en la actualidad (Jordan, 1990) (**Anexo 2**). Las pruebas de ELISA, las cuales llegan a ser técnicas semiautomáticas, se han vuelto populares, especialmente como procedimiento de evaluación de las parvadas y una variedad de dichas pruebas han sido

descritas. Se ha reportado una buena correlación entre las pruebas de ELISA y las de HI. (Alexander, 2003). Estas pruebas detectan diferentes tipos de anticuerpos; mientras que en ELISA son principalmente Igs G, en la prueba HI son Igs M, teniendo la prueba HI una muy buena sensibilidad para respuestas inmunes inducidas por cepas de campo y la prueba de ELISA para respuestas inducidas por cepas vacunales (Silva, 1997). Los resultados de las pruebas serológicas por lo general requieren de dos días, a diferencia de los cultivos virales que pueden tomar de 3 a 5 días hasta varias semanas (Gerlach, 1994).

El fluido alantoideo infectivo apropiadamente diluido puede ser utilizado como antígeno en pruebas de HI. El uso de antígenos no infecciosos por lo general es deseable, y para el vENC por lo general se utiliza como antígeno virus inactivado con formalina (fluido alantoideo infectivo tratado con formalina al 0.1%). Se puede utilizar β -propiolactona como alternativa en algunas instancias (Alexander, 1998). Los sueros de pollos raramente dan respuestas positivas no específicas en esta prueba y cualquier tratamiento previo del suero será innecesario (OIE, 2004). Existe evidencia que las menores variaciones antigénicas entre diferentes cepas del vENC pueden resultar en títulos diferentes por HI con el mismo antisuero. Esto es particularmente cierto cuando se utiliza la variante de paloma (PPMV-1) como antígeno (Alexander, 1998). Sueros de otras especies (incluyendo pavos) pueden ocasionar bajos títulos y aglutinación no específica de glóbulos rojos de pollos, complicando la prueba. Dicha aglutinación puede ser eliminada por adsorción con concentrado de glóbulos rojos de pollos antes de la prueba (Alexander, 2003; OIE, 2004) (**Anexo 3**). Alternativamente, el uso de células rojas de la especie homologa se puede tomar en consideración (Alexander, 1998).

Las pruebas de HA y HI no se ven muy afectadas por cambios menores en la metodología, aunque se ha recalcado la naturaleza crítica del período de incubación del complejo antígeno/anticuerpo en pruebas de estandarización. Estudios no siempre han reportado buena reproductividad en pruebas de HI entre distintos laboratorios (Alexander, 2003).

Existe una variedad de kits comerciales de ELISA y estos se basan en varias estrategias distintas para la detección de anticuerpos contra el vENC, incluyendo la forma indirecta, sándwich y competitividad o bloqueo utilizando MABs. Al menos uno de estos kits utiliza una subunidad de antígeno. Usualmente estas pruebas han sido evaluadas y validadas por el productor, y es por esto muy importante que se sigan cuidadosamente las instrucciones especificadas para su uso (OIE, 2004). La mayor ventaja de las pruebas ELISA es que suelen ser semiautomáticas, lo que permite la obtención de resultados rápidamente y de forma económica, especialmente cuando el suero debe ser analizado contra anticuerpos para varios virus. El valor de ELISA para el diagnóstico se ve afectado por la necesidad de modificar y validar la prueba para diferentes especies. Los ELISAs por lo general son muy sensibles y esto podría restringir su valor en pruebas diagnósticas cuando existen relaciones antigénicas, como es el caso de los paramixovirus aviares. Ambos problemas se pueden solucionar con el uso de ELISA competitivo empleando uno o más MABs, aunque se necesitaría buena evidencia que los

MABs reaccionarán con todas las cepas del vENC y no con los otros paramixovirus aviares (Alexander, 1998).

5.4. Técnicas Moleculares en el Diagnóstico de la Enfermedad de Newcastle

Las técnicas convencionales descritas previamente cubren la detección y una limitada caracterización viral pero favorecen muy poco al soporte en investigaciones epidemiológicas. Adicionalmente, estas técnicas son consideradas por muchos como lentas y laboriosas, requiriendo un uso inaceptable de animales, y sobretodo con costos altos. El desarrollo de técnicas diagnósticas por biología molecular en los años recientes, además del incremento en nuestros conocimientos de las bases moleculares de la patogénesis del vENC, han llevado a muchos científicos a investigar la posibilidad de que los diagnósticos convencionales puedan ser remplazados por técnicas basadas en la base molecular (Alexander, 2003). En 1999 se describió la secuencia de nucleótidos de la totalidad del genoma del vENC y esto permite el uso de técnicas de reversión genética. Estos avances deben llevar al establecimiento de la secuencia mínima de aminoácidos en el lugar de división F0 esenciales para la virulencia permitiendo de esta manera una más clara definición de los virus virulentos *in vitro* y un diagnóstico rápido y simple basado en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Brown et al, 2003).

La mayoría de las técnicas moleculares involucran reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y debido a que el vENC posee un genoma ARN, es esencial un paso inicial con transcriptasa reversa (RT) para producir copias del genoma de ADN (Alexander, 2003; Miller et al, 2005). Las ventajas más significativas de la PCR son: Especificidad, ya que se puede amplificar sólo al microorganismo que se está buscando detectar; Sensibilidad, debido a que permite la detección de cantidades muy pequeñas del material genético buscado; Velocidad, por que se puede realizar todo el procesamiento de la muestra en tiempos menores que con otras técnicas diagnósticas y Versatilidad, por que se puede aplicar esta técnica para el diagnóstico de innumerables microorganismos y a todo tipo de muestras (Hung et al, 2004).

Idealmente las técnicas moleculares podrían permitir la amplificación de los genomas virales directamente de tejidos infectados para evitar la necesidad de aislar el virus. Sin embargo, esto se ve impedido por la presencia de inhibidores de PCR en muchos órganos y tejidos, especialmente sangre y heces. No obstante, se ha logrado éxito amplificando un producto de 182 bp, incluyendo el lugar de división, directamente de tejidos infectados en pollos. La principal desventaja es que ningún tejido fue siempre positivo durante el tiempo de evaluación, siendo necesaria la utilización de un amplio rango de tejidos y órganos como muestra (Alexander, 2003).

La amplificación de la copia del ADN por PCR puede ser lograda utilizando primers universales que identifican meramente la presencia del vENC; los primers que amplifican áreas del genoma de los virus con propiedades específicas como por ejemplo, el patotipo, o la amplificación que combina estos, por lo general requiere nested PCR (Alexander, 2003). La

visualización del amplicón se realiza por electroforesis utilizando transiluminación UV y fotografía (Lauerman, 1998).

Actualmente la PCR y la RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) están siendo utilizadas como métodos de rutina para el diagnóstico en muchos laboratorios en países desarrollados (Hung et al, 2004). Debido a su alta sensibilidad, la técnica de RT-PCR puede ser utilizada como método de diagnóstico para la detección del vENC en muestras clínicas (Angadji et al, 2005), obteniéndose resultados en 3 o 4 horas (Wang et al, 2000). En un estudio reciente se ha observado una sensibilidad considerablemente menor para la detección del vENC por la inoculación de embriones SPF en comparación con RT-PCR, para ambas pruebas el tejido de elección fue el tejido de cerebro (Jorgensen et al, 2005). En otro estudio se encontró una concordancia entre los resultados obtenidos entre RT-PCR y aislamiento viral de entre 73 y 100% (Domanska-Blicharz et al, 2005). Se han diseñado RT-PCR múltiples en donde los primers amplifican las regiones entre los genes de las proteínas P y F. Los resultados de las pruebas preliminares sugieren que los primers serán efectivos en discriminar cepas lentogénicas de velogénicas pero aún falta determinar la especificidad de estas pruebas (Sellers et al, 2005). Estas pruebas no sólo son rápidas, sino que también han demostrado tener una sensibilidad al menos igual a la del aislamiento viral convencional (Omar et al, 2005). También se han estudiado pruebas múltiples para la detección simultánea de virus ARN que ocasionan problemas respiratorios en aves como Influenza Aviar (AIV), Bronquitis Infecciosa (IBV), APMV-1 y Pneumovirus aviar (APV) en una sola reacción. Se han desarrollado exitosamente pruebas RT-PCR para APMV-1, IBV y APV con alta sensibilidad y especificidad (Lu et al, 2005). Otro avance es el desarrollo de pruebas RT-PCR en tiempo real (RRT-PCR o Real-time RT-PCR) las cuales han sido validadas para un rápido diagnóstico de la ENC, demostrándose una buena correlación entre la prueba y la titulación viral en la cuantificación de la carga viral (Miller et al, 2005) a partir de muestra clínicas (Wise et al, 2004).

El producto generado por PCR puede ser diseñado para ser utilizado específicamente en estudios moleculares posteriores dirigidos a dar una mayor información sobre las propiedades o los orígenes del virus infectivo. Dichos estudios han incluido análisis de enzimas de restricción (REA), sondas de hibridización y secuenciamento de nucleótidos para el análisis del lugar de división del gen F (Alexander, 2003; OIE, 2004). Se ha encontrado una correlación perfecta entre REA y secuenciamento (Smietanka et al, 2005). El REA también ha sido descrito como un método simple y confiable para la identificación y el sub agrupamiento de las cepas variantes de paloma (Ujvari et al, 2005). El RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) es una técnica molecular que sirve para confirmar el diagnóstico realizado en el RT-PCR mediante el uso de enzimas de restricción (Hung et al, 2004). Se ha reportado el desarrollo y la aplicación de RT-PCR de un solo paso en conjunto con REA (Análisis de endonucleasa de restricción) como un método rápido y específico tanto para la detección como la tipificación de APMV-1 de muestras de campo (Creelan et al, 2002). Varios grupos han reportado el uso de sondas en una variedad de pruebas que reconocen sitios específicos en el genoma del vENC y, por ende,

caracterizan al virus, al menos identificando su virulencia. Las ventajas de dichas técnicas son que son rápidas, pueden ser automatizadas y permiten un gran número de muestras para ser analizadas. Las desventajas, como sucede con los primers primarios destinados a identificar el patotipo, son debido a que los vENC muestran variaciones considerables en el lugar de división, es poco probable que las pruebas diseñadas reconozcan a todos los vENC. Como la secuenciación de nucleótidos se vuelve cada vez más automatizada y rápida, podría parecer en la actualidad que permanezca siendo la técnica preferida para la evaluación de la virulencia (Alexander, 2003).

También se ha desarrollado una prueba de motilidad heteroduplex (HMA) para ayudar a una identificación más avanzada de los marcadores moleculares como predictores de virulencia. Esta técnica podría ser utilizada para el monitoreo inicial de un gran número de aislamientos y determinaría una rápida identificación del potencial de virulencia (Berinstein et al, 2001).

La evaluación de la prueba de LAMP (Amplificación Isotérmica Mediada por Vuelta – Loop-mediated isothermal amplification) ha demostrado ser más rápida que nested PCR, costo efectiva y fácil de realizar. Los resultados demuestran claramente que el ensayo basado en LAMP es una herramienta útil para el diagnóstico rápido y sensitivo de la infección por el vENC (Pham et al, 2005).

En el diagnóstico de la ENC es importante comprender que la demostración de la presencia de virus con múltiples aminoácidos básicos en el lugar de división de la proteína F0 confirma la presencia de virus virulentos o potencialmente virulentos, pero la falla en la detección de virus o la detección de vENC sin la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el lugar de división F0 utilizando técnicas moleculares no confirma la ausencia de virus virulentos. La utilización de un primer no adecuado, o la posibilidad de una población mixta de virus virulentos y avirulentos significa que el aislamiento viral y la determinación de la virulencia in vivo seguirán siendo requeridas (OIE, 2004).

Se debe prestar atención cuando se aísla de campo una cepa no virulenta del vENC que presenta sólo uno o dos aminoácidos diferentes en el lugar de división de la proteína F comparados con cepas virulentas ya que estas pueden evolucionar a cepas virulentas (De Leeuw et al, 2003).

5.5. Diagnóstico Diferencial

Generalizando, el vENC produce signos clínicos que involucran los tractos respiratorio, digestivo y el sistema nervioso, como resultado, cualquier infección, toxina u otra condición que resulte en dichos signos, ya sean leves o severos, deben de ser investigados, por ser considerados sospechosos de ENC hasta llegar al diagnóstico definitivo (Alexander, 1989). Dentro de las enfermedades que afectan a las aves, las principales que se deben tener en consideración para el diagnóstico diferencial con la ENC son: Influenza aviar, Bronquitis infecciosa, Pneumovirus, Laringotraqueítis aviar, Micoplasmosis, Cólera aviar, Coriza infecciosa, ORT (*Ornithobacterium rhinotracheale*), Bordetella aviar, Viruela aviar en su forma diftérica,

Infecciones fúngicas (*Aspergillus sp.*, *Dactylaria gallopava*), Enfermedad de Marek, Encefalomiелitis aviar, septicemias y cierto tipo de intoxicaciones (Villegas, 2003; OIE, 2002; SENASA, 2004; Brugh, 1983; Swayne, 2003a). También deben considerarse errores en el manejo tales como privación de agua y/o alimento y mala calidad del aire (OIE, 2002; SENASA, 2004). También tiene que considerarse la contaminación del agua o alimento con químicos como sulfas, rodenticidas a base de monofluoroacetato sódico o vermífugos nicotínicos, que si bien son poco comunes en la avicultura comercial, deben ser considerados en el diagnóstico diferencial en aves de traspatio y en avicultura de aldeas (Swayne, 2003a).

La actividad HA viral puede ser debida a cualquiera de los nueve serotipos de los paramixovirus aviares o cualquiera de los 15 subtipos de influenza A que se conoce pueden infectar a aves (Alexander, 2003). La diferenciación preliminar del APMV-1 con los virus influenza puede ser lograda por la examinación bajo microscopio electrónico en donde la tinción con contraste negativo revelará las diferencias morfológicas, donde lo más notable será la presencia de la nucleocápside característica emergiendo de los APMV-1. La habilidad de los APMV-1 de hemolizar glóbulos rojos de pollos a pH de 7.0, a diferencia de los virus de influenza, también ha sido utilizada en el pasado para la diferenciación (Alexander, 1998). La demostración que el APMV-1 es de un serotipo específico usualmente puede ser llevada a cabo por una prueba simple de HI con el antisuero policlonal específico (Alexander, 2003).

El vENC (APMV-1) muestra reacción cruzada en pruebas de HI con muchos de los otros paramixovirus aviares, especialmente con el APMV-3 aislado de aves psitácidas, utilizando antisuero policlonal (Alexander, 1988; King, 1999; Jordan, 1990) y con el APMV-7 (OIE, 2004). Cabe mencionar que algunos países vacunan pavos contra el APMV-3 y en algunos países se han llevado a cabo pruebas con vacunas contra APMV-2 (Alexander, 1998). Aunque el potencial para un error en el diagnóstico puede ser ampliamente eliminado con el uso de un suero control y antígenos en las pruebas convencionales, el uso de MABs en el diagnóstico de rutina puede dar resultados inequívocos (Alexander, 2003).

VI. Estrategias de Intervención

Sin importar si el control para la ENC se aplica a nivel internacional, nacional o de granja, el objetivo es el prevenir que aves susceptibles se infecten o el de reducir el número de aves susceptibles por medio de vacunación. Cualquiera sea la estrategia, cada método de diseminación de la enfermedad debe ser considerado en las políticas preventivas (Alexander, 2003).

La amenaza de la ENC es real y muy importante para la industria avícola. Aves presentadas para cuarentena y aves confiscadas por las aduanas en los EEUU han sido una fuente para los aislamientos de la cepa VVND todos los años con excepción de tres desde 1971 (King, 1999).

6.1. Procedimientos de Manejo

6.1.1. Políticas Internacionales de Control

La uniformidad en los estándares y una comunicación abierta son muy importantes para la armonización y promoción internacional del comercio de animales y productos de origen animal (King, 1999).

La avicultura comercial y el comercio de sus productos están ahora organizados internacionalmente, frecuentemente se encuentran bajo el manejo de compañías multinacionales y existe el deseo de comercializar ambos, productos avícolas y genética. La amenaza del vENC, sin embargo, ha demostrado ser una gran restricción sobre dicho comercio (Alexander, 2003) y si bien sólo es obligatoria la notificación de las cepas virulentas del vENC, la presencia de cepas del APMV-1 de baja virulencia puede tener un impacto negativo sobre el comercio entre países individuales (Swayne, 2003a).

Se considera que el control de la ENC a nivel mundial podrá ser logrado sólo si todos los países reportan los brotes dentro de sus fronteras a las agencias internacionales. Acuerdos internacionales sobre estos y otros puntos no son simples, debido a las enormes variaciones en la extensión de la vigilancia de la enfermedad y las capacidades en el diagnóstico en diferentes países (Alexander, 2003).

Un prerrequisito para formular políticas de control, particularmente a nivel internacional, sería el acuerdo sobre qué constituye la enfermedad y sobre qué virus se deben aplicar medidas de control. Algunos países no vacunan y no van a permitir la introducción de ninguna forma de vENC en sus países. Otros, sólo permiten vacunas vivas específicas y consideran algunas vacunas como inapropiadas por su virulencia. Incluso otros países tienen la presencia continua de virus virulentos circulantes, los cuales no presentan cuadros visibles debido a la vacunación. La OIE es el organismo responsable ante la Organización Mundial de Comercio para la estandarización de materias que involucran la salud animal y que puedan afectar el comercio (Alexander, 2003) y una de sus principales misiones es proveer información sobre la situación de la salud animal a nivel mundial con toda transparencia (OIE, 2005a). La mayoría de países en Norte y Sur América son países miembros de la OIE y de esta manera están de acuerdo en reportar toda información necesaria para minimizar la exposición de importantes enfermedades que afectan a los animales (King, 1999). Todos los miembros deben realizar la notificación de la detección de la ENC dentro de las primeras 24 horas (WPT, 2004).

En mayo del 2004, los 167 países miembros de la OIE aprobaron la creación de una lista única de enfermedades notificables al organismo (**Anexo 4**), la cual consta de 15 enfermedades aviares, anteriormente estas enfermedades se clasificaban en dos listas (Lista A y Lista B) y la Enfermedad de Newcastle, junto con la Influenza Aviar, eran las únicas dos enfermedades aviares pertenecientes a la Lista A (OIE, 2005a).

La nueva definición de la OIE incorpora el ICPI como un criterio de virulencia como lo requiere la definición de la Unión Europea desde 1992 (Directiva 92/66/EEC) (CEC, 1992) y añade una definición molecular alternativa del lugar de división de la proteína de fusión (King, 1999); lo cual refleja el entendimiento actual de las bases moleculares para la virulencia (Alexander, 2003).

Una consecuencia del cambio en la definición es la eliminación por la OIE de los términos velogénico, mesogénico y lentogénico en la caracterización de las cepas del vENC (King, 1999).

La nueva definición de la ENC incluye procedimientos similares a aquellos establecidos actualmente para la evaluación de la virulencia de los virus de Influenza Aviar, eliminando la inicial e imprecisa definición de la ENC que podía llevar a confusiones en la interpretación. (King, 1999). Algunos laboratorios tienen facilidades para efectuar el análisis molecular pudiendo no tener las facilidades para efectuar las pruebas del ICPI. La prueba del ICPI es requerida cuando la prueba molecular falla en detectar el patrón característico de los aminoácidos (King, 1999).

Un punto crítico que persiste incluso con la nueva definición de la OIE es la definición de los procedimientos de importación que establecen el estatus de un país o región cuando se ha identificado al vENC en una especie distinta a la que se va a exportar. Por ejemplo, el estatus para la exportación de pollos que no muestran evidencia de la ENC permanece a ser definido si es que en la misma región existe un reporte del aislamiento del vENC de palomas o aves silvestres con propiedades de una cepa virulenta (King, 1999).

Las estrechas relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas en los brotes recientes (2002 – 2003) en los EEUU y los virus de países geográficamente cercanos a los EEUU exigen una vigilancia continua de las aves comerciales y no comerciales para la detección temprana de los vENC altamente virulentos (Pedersen et al, 2004).

Cuadro N° 8: Clasificación de patotipos según nueva definición de la OIE

Patotipo o cepa	ICPI	Secuencia de aminoácidos en el lugar de división de la proteína F (Número de residuo)					Nueva definición según OIE
		113	114	115	116	117	
Lentogénico	< 0.7	R	Q	G	R	L	Baja virulencia
Mesogénicos	1.6	R	Q	K	R	F	Virulento
VVND – Velogénico	1.8	R	Q	K	R	F	Virulento
NVND – Velogénico	1.7	R	Q	K	R	F	Virulento
Variante paloma	0.3-1.8	R	Q	K	R	F	Virulento

F: fenilalanina; G: glicina; K: lisina; L: leucina; Q: glutamina; R: arginina.

Infecciones en aves con virus que tienen propiedades similares a aquellos identificados como virulentos en la tabla son definidas como Enfermedad de Newcastle.

Fuente: Hoerr, 2004

6.1.2. Políticas de Control Nacional

A nivel nacional, las políticas de control están dirigidas a la prevención de la introducción del virus y a la prevención de la diseminación del virus dentro del país. Para prevenir la introducción del vENC, la mayoría de los países tienen restricciones en el comercio de productos avícolas, huevos y aves vivas; estos varían ampliamente dentro de los parámetros permitidos por los códigos de salud animal de la OIE (Alexander, 2003).

Si bien sólo las cepas virulentas requieren la notificación obligatoria, la habilidad para identificar correctamente todos los tipos de APMV-1 es importante para el control y los objetivos regulatorios (Seal et al, 2005).

Debido a la relación entre aves exóticas en cautiverio y la diseminación de la ENC en la panzootia de 1970- 1974 y la ya conocida habilidad de las aves psitácidas para excretar el vENC por varias semanas después de la infección, la mayor parte de los países importadores de estas aves han establecido procedimientos de cuarentena para las importaciones que por lo general incluyen un periodo de aislamiento de 35 días bajo supervisión veterinaria y el monitoreo para aislamiento viral para ENC (Jordan, 1990).

La panzoótia del vENC en palomas de carrera en la década de los años 80s produjo una situación única, en vista de la potencial diseminación hacia aves de corral. Debido al gran número de carreras internacionales de palomas que se llevan a cabo cada año, se crearon políticas nacionales en algunos países tales como eliminación o restricción de carreras o la implementación de la vacunación obligatoria para las palomas participantes (Alexander, 2003).

En muchos países existe legislación para controlar la aparición de brotes de ENC. Algunos países han adoptado medidas de erradicación tales como la eliminación obligatoria de todas las aves infectadas, lo que estuvo en contacto con ellas y sus productos. Tales políticas por lo general incluyen la restricción de movimiento o el mercadeo de aves dentro de un área de cuarentena definida alrededor del brote. Otros requieren vacunación profiláctica de aves incluso en ausencia de brotes, y algunos tienen una política de vacunación en forma de anillo alrededor de los brotes para establecer una zona amortiguadora (Alexander, 2003; Jordan, 1990).

Se ha recalcado la importancia de aplicar políticas de control a la medida del país y se ha prevenido sobre las aplicaciones dogmáticas de políticas que han sido exitosas en un país hacia otro que podría diferir socialmente, económicamente y climáticamente (Alexander, 2003).

En países donde existe una importante crianza de animales de traspatio y la enfermedad se encuentra de forma endémica es poco probable que la vacunación por si sola pueda resolver el problema a menos que paralelamente se realicen programas de educación sobre la enfermedad y su diseminación y sobre la adecuada crianza de animales (Brown et al, 2003).

En algunos países existe una legislación diseñada para reducir la posibilidad de la aparición de un brote a partir de fuentes específicas, tal es el caso de Irlanda en donde existe un requerimiento legal para tratar con calor todo alimento destinado a las aves con la finalidad de reducir la posibilidad de introducción del vENC por esta ruta (Alexander et al, 2004).

6.1.3. Control y Prevención a nivel de Granja

Probablemente el factor más importante en la prevención de la introducción del vENC y su diseminación durante los brotes son las condiciones bajo las cuales las aves son criadas y el grado de bioseguridad practicado en la granja (Alexander, 2003).

Cuando ocurren brotes de la enfermedad, surgen mayores problemas de higiene a nivel de granja. En donde no existe una política de eliminación de animales, debe contemplarse igualmente la despoblación, especialmente si existen aves de múltiples edades, en donde la presencia continua de aves susceptibles puede resultar en la perpetuación del virus incluso con el uso de vacunas. Después de la despoblación, todas las aves y sus productos, incluyendo las heces deben ser eliminadas de forma correcta. Luego las instalaciones deben ser cuidadosamente limpiadas, desinfectadas, de preferencia fumigadas y permanecer desalojadas por un período de varias semanas antes de la repoblación (Jordan, 1990).

Posiblemente la mayor ayuda para implementar medidas de bioseguridad e higiene que puedan prevenir o controlar a la ENC es la educación de los granjeros y de aquellos que trabajan con las aves con respecto a la diseminación del virus y las medidas a tomar para

evitarlo. La mejor herramienta para el control de la ENC a cualquier nivel, tanto internacional, nacional o de granja, es un eficiente y bien manejado servicio de extensión avícola (Alexander et al, 2004).

6.1.4. Bioseguridad

Bioseguridad cubre todos los procedimientos necesarios para prevenir las consecuencias de la enfermedad. Estos procedimientos incluyen la selección de aves libres de la enfermedad, facilitar los ambientes adecuados y los procedimientos que puedan prevenir la exposición de la parvada a la enfermedad (King, 1999). Las granjas y parvadas deben estar bien separadas, las plantas de incubación deben estar aisladas de las granjas de producción, diferentes especies deben ser criadas en diferentes lugares y debe existir una adecuada fuente de agua fresca (Alexander et al, 2004).

En países desarrollados, en donde la avicultura industrial se encuentra establecida con áreas altamente concentradas, muchas de estas medidas son difíciles de implantar debido a la poca disponibilidad de espacio, sin embargo, en países en donde la industria avícola se encuentra en pleno desarrollo se deberían adoptar estas medidas (Alexander et al, 2004).

Aunque muchas medidas de bioseguridad son frecuentemente consideradas como costosas, onerosas y que toman mucho tiempo para el personal, si dichas medidas son implementadas, no hay duda que la introducción de los virus de la ENC a las parvadas y la diseminación hacia el resto de la industria avícola, se verá reducida dramáticamente. Dichas medidas probablemente también reducirán la diseminación de otras enfermedades endémicas que podrían afectar a las aves y reducir su rendimiento y deben ser consideradas como una inversión importante en la rentabilidad de la producción avícola (Alexander, 2003).

Los componentes de un sólido programa de bioseguridad han sido divididos en tres niveles: Bioseguridad conceptual, Bioseguridad estructural y Bioseguridad operacional (King, 1999).

La Bioseguridad conceptual tiene que ver con la localización de la granja para evitar contacto con fuentes potenciales de infección y mantener una óptima producción (King, 1999). Idealmente, debería iniciarse en la etapa de desarrollo de una granja de producción comercial, las granjas avícolas y las parvadas estarán mejor ubicadas bien distantes unas de otras y no en los típicos amontonamientos observados en la mayoría de países desarrollados (Jordan, 1990).

La Bioseguridad estructural incluye los planos de las construcciones de la granja, descontaminación de las facilidades, manejo del alimento, diseño de las construcciones para prevenir la entrada de animales y aves extrañas y habitaciones para que los trabajadores puedan cambiarse y colocarse ropa que sólo se usa en la granja (King, 1999). Cierta forma de seguridad debe ser impuesta en todas las granjas y galpones para prevenir el fácil acceso de personas ajenas y fomites. En el caso de aves reproductoras se recomienda la instalación de duchas obligatorias y cambio de ropa del personal al ingresar y salir del plantel (Jordan, 1990).

La Bioseguridad operacional comprende todos los procedimientos administrativos y rutinarios que previenen la introducción y distribución de la infección, estos procedimientos

incluyen cosas como control de tráfico, vacunaciones y programas de vigilancia epidemiológica (King, 1999). Idealmente, los vehículos deben ser desinfectados minuciosamente al ingresar y abandonar las instalaciones. Cualquier movimiento directo entre instalaciones debe ser evitado (entrega de alimento, recolección de huevos, recolección de animales muertos, etc.) (Jordan, 1990). Se recomienda la crianza de animales de una sola edad (all in – all out), además de respetar un período de descanso antes de la repoblación de los galpones de 21 días (OIE, 2002; SENASA, 2004).

Una efectiva bioseguridad simplemente requiere gran atención en todos los detalles relacionados con la producción avícola (King, 1999). Buena higiene complementada con buenas prácticas de manejo son de crítica importancia en cualquier momento, y no estrictamente durante la presentación de un brote (Jordan, 1990).

6.2. Vacunación

El vENC por ser antigénicamente relativamente estable es un excelente agente para la producción de vacunas, las cuales son altamente eficientes para la inmunización de plantales, control de brotes y erradicación de la enfermedad (Martins, 2003).

Idealmente la vacunación contra la ENC debería resultar en la inmunidad contra la infección y la replicación del virus. En la realidad, la vacunación contra ENC por lo general protege al ave contra las consecuencias más serias de la enfermedad, pero la replicación y eliminación pueden todavía ocurrir aunque en niveles reducidos (Alexander, 2003; King, 1999). La correcta administración de vacunas puede prevenir la muerte, signos clínicos e incluso problemas en la producción de huevos en aves vacunadas y luego expuestas a reto viral (Brown et al, 2003).

Virus virulentos de la ENC pueden infectar y replicarse en aves vacunadas sin presentar signos clínicos, lo cual puede llevar a la diseminación y a una situación endémica antes de que se reconozca la presencia del virus virulento (Brown et al, 2003). La capacidad del virus para replicarse y eliminarse a partir de animales vacunados nos recalca la necesidad de desarrollar vacunas y estrategias de vacunación para ser utilizadas durante situaciones de brote, no sólo para proteger a las aves de la enfermedad y la infección, sino también para reducir la eliminación viral (Kapczynsly et al, 2005).

Se debe enfatizar que bajo ninguna circunstancia la vacunación debe ser vista como una alternativa a buenas prácticas de manejo, bioseguridad o higiene en la crianza de aves de corral (Alexander, 2003). Bajo condiciones de campo, la vacunación por si sola es insuficiente para controlar efectivamente la ENC y debe estar acompañada por una buena higiene. En parvadas con malas condiciones de manejo, con sobrepoblación y malas condiciones de ventilación resultan infecciones bacterianas subyacentes las cuales pueden ocasionar, incluso con las cepas más suaves, reacciones post vacunales que podrían asemejar una infección con una cepa virulenta (Jordan, 1990). Cuando se encuentran presentes infecciones con otros agentes, se recomienda la utilización de vacunas inactivadas (Merck, 2005).

La vacunación reduce la posibilidad de que las aves se infecten, pero una vez que una parvada se encuentra infectada, la vacunación puede enmascarar los síntomas y lesiones de una infección con VVND (King, 1999).

Los programas de vacunación deben considerar ambos conceptos, la forma virulenta de la ENC que es una enfermedad de preocupación internacional, así como las infecciones con cepas del vENC de baja virulencia que son tratadas de forma diferente en cada país (King, 1999).

6.2.1. Aspectos Históricos de la Vacunación

Estudios iniciales demostraron que material infectivo inactivado confería protección en pollos inoculados, pero problemas en la producción y estandarización desalentaron su uso a gran escala. Estudios en los años 30 sobre la atenuación de cepas virulentas del vENC llevaron al desarrollo de las vacunas con cepas mesogénicas que siguen estando en uso en algunas partes del mundo (Alexander, 2003). Después del brote en 1933 en Inglaterra se produjo una vacuna viva atenuada llamada cepa H (Alexander et al, 2004).

La identificación de la ENC en los EEUU inicialmente los llevó a la utilización de vacunas inactivadas. La posterior observación que algunos virus enzoóticos producían sólo una leve enfermedad resultó en el desarrollo de la vacuna viva mesogénica Roakin y, subsecuentemente, la cepa más suave Hitchner B1 y la cepa La Sota, que son actualmente las vacunas más utilizadas (Alexander, 2003; Brown et al, 2003).

Las vacunas inactivadas, usualmente con el virus adsorbido en hidróxido de aluminio, fueron utilizadas más ampliamente en Europa hasta la panzootia entre 1970 y 1974, pero su bajo performance en esos tiempos resultó en la adopción de la vacunación a vacuna viva con las cepas B1 y La Sota en la mayoría de países. Esta panzootia también aportó la necesidad de desarrollar las vacunas inactivadas modernas basadas en emulsiones oleosas, que han demostrado ser altamente eficaces (Alexander, 2003).

6.2.2. Políticas de Vacunación

Algunos gobiernos tienen legislaciones que afectan el uso y el control de calidad de las vacunas. Las políticas varían enormemente, en línea con el estatus enzoótico o la amenaza percibida de ENC. Algunos países, tales como Suecia, prohíben el uso de cualquier vacuna, y otros, como Holanda, imponen la vacunación de todas las aves de corral. Países de la Comunidad Europea han legislado para definir la patogenicidad de los virus que serán permitidos para su uso en la vacunación en los países miembros (Comission Decision 93/152/EEC) donde se detalla que la semilla maestra de las vacunas vivas debe ser probada bajo condiciones de dosis específicas y mostrar tener valores ICPI menores a 0.4 si se administra a cada ave no menos de 10^7 EID₅₀ (Dosis Infectiva promedio en huevo) o < 0.5 si se administra no menos de 10^8 EID₅₀ a cada ave. La semilla maestra de virus utilizados en vacunas inactivadas debe tener un valor menor a 0.7 de ICPI si se administra no menos de 10^8 EID₅₀ a cada ave (Council of the European Communities, 1993; OIE, 2004). La OIE adoptó pautas

similares (OIE, 2000), en donde se recomienda que si bien en principio las vacunas deben tener un ICPI < 0.7 para considerar las variables inter-ensayo e inter-laboratorios, se debe permitir un margen de seguridad en donde las semillas maestras de las vacunas no deben tener un ICPI que exceda 0.4 (OIE, 2004). Adicionalmente a las políticas de control de los gobiernos, la situación de prevalencia de la enfermedad y otros factores afectan los programas de vacunación. Estos factores incluyen aspectos como la disponibilidad de vacunas, inmunidad maternal, otras enfermedades, usos de otras vacunas y costos (King, 1999).

6.2.3. Vacunas Vivas

a. Cepas Virales

Es conveniente dividir las vacunas vivas contra la ENC en dos grupos, lentogénicos y mesogénicas. Cepas de ambos grupos han sido sujetas a selección y clonación para cumplir con los diferentes criterios en su producción y aplicación (OIE, 2004). Hay que tomar en cuenta que las vacunas mesogénicas caen dentro de la definición actual de la OIE para los virus responsables de la ENC y esto podría afectar la utilización de las mismas en un futuro (King, 1999) aunque no necesariamente signifique su prohibición en países en donde el vENC es endémico y donde son apropiadas para la segunda vacunación de aves debido a su virulencia y a su capacidad de producir una alta respuesta inmune secundaria (Jordan, 1990; OIE, 2004). Todas las vacunas mesogénicas tienen dos pares de aminoácidos básicos en el lugar de división F0 y valores de ICPI de alrededor de 1.4 (OIE, 2004). Incluso con las vacunas lentogénicas, existe un considerable rango de virulencia, como ha sido demostrado por pruebas que evalúan el efecto potencial de las vacunas sobre pollos susceptibles. La respuesta inmune aumenta al aumentar la patogenicidad de la vacuna viva. Por lo tanto, para obtener el nivel deseado de protección sin reacciones serias, los programas de vacunación necesitan involucrar la utilización secuencial de vacunas vivas con virus progresivamente más patógenos o virus vivos seguidos por vacunas inactivadas (Alexander, 2003). Hasta hace un tiempo se decía que la protección estaba directamente relacionada con la reacción postvacunal, esto actualmente no es completamente cierto pues ya existen cepas vacunales capaces de inducir buena protección con una mínima reacción respiratoria postvacunal (Villegas et al, 1995).

Las cepas B1 y La Sota son las más utilizadas y se replican en el aparato respiratorio produciendo respuesta inmune local y humoral. La cepa La Sota induce una rápida inmunidad aunque tiene mayor potencial de causar enfermedad respiratoria por ser una cepa más invasora, por lo tanto, no se recomienda como primera vacuna, pero sí como una revacunación en aves vacunadas previamente con la cepa B1 para aumentar la respuesta inmunitaria. Por otra parte, la cepa B1 es considerada como una cepa de baja agresividad o patogenicidad, induciendo una protección más lenta y menor que la obtenida con la cepa La Sota (Villegas et al, 1995). Las cepas clonadas, que derivan de cepas lentogénicas como La Sota, producen una reacción incluso menor que la cepa B1 y por lo tanto una menor inmunogenicidad (Antillon, 2005).

Vacunas formuladas con las cepas lentogénicas V4, F, Ulster 2C, NDW, I2 o VG-GA han sido igualmente utilizadas (King, 1999; Jordan, 1990; OIE, 2004). Las vacunas vivas mesogénicas conteniendo cepas del vENC como la Roakin, Mukteswar, Komarov, Haifa, Herefordshire y H por lo general han sido derivadas en el laboratorio a partir de cepas virulentas y no se encuentran autorizadas en la mayoría de países latinoamericanos (Jordan, 1990; Antillon, 2005). Existen también cepas adaptadas a cultivos celulares que son cepas mesogénicas atenuadas por adaptación a cultivos celulares (California 11914 y Komarov), estas vacunas tampoco se encuentran autorizadas para ser utilizadas en Latinoamérica (Antillon, 2005).

La cepa VG-GA se replica en el aparato respiratorio y en el intestino y produce una respuesta inmune comparable con la B1. Estas cepas tienen la capacidad de inducir protección en niveles similares a aquellos obtenidos con cepas agresivas, pero sin la característica de producir reacciones postvacunales (Villegas et al, 1995). Se ha demostrado una protección efectiva con el uso de dos cepas intestinales (VG-GA y PHY.LMV.42) contra VVND (Alba et al, 2002).

Para la vacunación en lugares en donde no se puede mantener la cadena de frío, se han desarrollado vacunas termoestables a partir de virus entéricos asintomáticos que presentan esta característica naturalmente, la vacuna de este tipo más ampliamente utilizada ha sido la V4HR y más recientemente se ha desarrollado la vacuna I2 (Alexander et al, 2004).

Se ha evaluado el uso de los adyuvantes oleosos, normalmente utilizados con las vacunas inactivadas, con las vacunas vivas logrando mejorar la inmunogenicidad (Alexander et al, 2004).

Pollos saludables pueden ser vacunados con vacuna viva tan tempranamente como al primer día, pero el postergar la vacunación hasta la segunda o tercera semana incrementa su efectividad (OIE, 2002). La vacunación al primer día de pollos totalmente susceptibles, incluso con las cepas más suaves, puede resultar en enfermedad respiratoria (OIE, 2004).

Programas que utilizan exclusivamente vacunas vivas presentan una inmunidad muy corta, por lo que en zonas enzoóticas se requiere de revacunaciones cada 15 o 20 días (Antillon, 2005).

No existe duda sobre la eficacia de cualquiera de las vacunas contra la ENC en pollos completamente sensibles, pero la inmunización de pollos con anticuerpos maternos no es igual de predecible (King, 1999) y más aún si se considera que la inmunidad maternal puede variar de granja a granja, de lote a lote e inclusive entre individuos (OIE, 2004). Esto es una preocupación particular cuando se trata de crear inmunidad ante la presencia de cepas virulentas de virus indógenos. La utilización de cepas mesogénicas más invasivas tal como la cepa Roakin y Komarov como una vacunación secundaria luego de una vacunación inicial con una cepa lentogénica tipo B1 o La Sota fue un método utilizado para vencer la inmunidad maternal y sigue utilizándose en algunos países (King, 1999).

Cuadro N° 9: Ejemplos de vENC utilizados como vacunas

Virus	Patotipo	ICPI	Derivación	Uso en pollos	Rutas
La Sota	Lentogénico	0.4	Aislado de campo	Primaria	In, io, dw, sp, aer
F (Asplin)	Lentogénico	0.25	Aislado de campo	Primaria	In, io, dw, sp, aer
Hitchner B1	Lentogénico	0.2	Aislado de campo	Primaria	In, io, dw, sp, aer, bd
V4	Entérico asintomático	0.00	Aislado de campo	Primaria	In, io, sp, aer, or
Cepa H (*)	Mesogénico	1.4	Atenuado por pasajeo en huevos	Secundaria	im, sc
Mukteswar (*)	Mesogénico	1.4	Atenuado por pasajeo en huevos	Secundaria	im, sc
Roakin (*)	Mesogénico	1.45	Aislado de campo	Secundaria	im, ww

(*) Aunque todavía son utilizadas en áreas en donde la ENC es endémica, las vacunas mesogénicas caen dentro de la definición de virus causantes de la ENC por la OIE.

in: intranasal; io: intraocular; dw: agua de bebida; sp: spray; aer: aerosol; bd: sumergido de pico; or: oral; im: intramuscular; sc: subcutáneo; ww: punción alar

Fuente: Alexander, 2003

b. Aplicación de Vacunas Vivas

El objetivo de las vacunas vivas es el establecer una infección en la parvada, preferentemente en cada ave al momento de la aplicación. Los métodos de aplicación de las vacunas variará según la cepa (Jordan, 1990). El tratamiento individual de cada ave como, la instilación intranasal, gota ocular, sumergida de pico o agua de bebida son comúnmente utilizadas para vacunas lentogénicas. Las vacunas mesogénicas por lo general requieren la inoculación por punción alar o inyección intramuscular (Alexander, 2003).

La mayor ventaja de las vacunas vivas es que pueden ser administradas por técnicas poco costosas a nivel de masa. Probablemente la forma más común de aplicación utilizada a nivel mundial es vía el agua de bebida. Generalmente el agua es retirada de las aves un número de horas y luego la vacuna es aplicada en agua de bebida fresca en concentraciones cuidadosamente calculadas para asegurar a cada ave una dosis suficiente. La adición de la vacuna a los tanques de agua también ha sido utilizada con éxito. La aplicación en agua de bebida debe ser cuidadosamente monitoreada ya que el virus puede ser inactivado por excesiva temperatura ambiental, impurezas en el agua e incluso el tipo de tuberías utilizadas para distribuir el agua. La viabilidad de los virus puede ser estabilizada, en cierto grado, por la adición de leche descremada al agua de bebida (Alexander, 2003; Jordan, 1990).

La aplicación en masa de las vacunas vivas por aspersión es también muy popular debido a la facilidad con la que un gran número de aves puede ser vacunado en un corto período de tiempo. Es importante lograr el adecuado tamaño de partícula por medio del control de las condiciones mediante las cuales el aerosol es generado (Alexander, 2003). La selección del tamaño de la gota será determinante para crear un equilibrio entre la eficacia y la reacción post-vacunal. El tamaño de la gota debe de ser de 75 a 150 micrones, con una concentración de 200 o más gotas por centímetro cuadrado (Nuñez Correa et al, 2002). La aplicación por aerosol por lo general esta limitada a la revacunación para evitar reacciones post-vacunales severas, ya sea por el mismo agente viral o por agentes secundarios como *E. coli* o *Mycoplasma*

sp. (Comotto, 2000). La aspersión con gota gruesa (150 μ m) asemeja la vacunación por gota ocular (King, 2002), ya que logra que la gota no logre penetrar profundamente en el tracto respiratorio de las aves ocasiona menos reacciones, así que esta puede ser más adecuada para la aplicación de la vacuna en masa a aves jóvenes. La aspersión por gota gruesa de los pollitos BB puede resultar en el establecimiento de la infección en la parvada con el virus vacunal a pesar de la inmunidad maternal. Se cree, sin embargo, que bajo estas circunstancias, la infección se establece por las rutas ocular o nasal como resultado del rozamiento de las cabezas contra las espaldas de otras aves y no necesariamente como consecuencia directa de la aspersión (Alexander, 2003). El uso de partículas de menor tamaño está limitado a las revacunaciones. El empleo de inmunizaciones repetidas por aspersión ha prevenido exitosamente la presencia de la forma virulenta de la ENC y constituye una alternativa a la administración de la vacuna viva combinada con la inactivada (King, 2002). Existen generadores de aerosol y aspersión disponibles comercialmente, en los EEUU se utiliza comúnmente una cabina de aspersión para la vacunación de pollitos BB de un día de edad (Alexander, 2003). El uso de la cepa La Sota en forma de aerosol en aves totalmente susceptibles puede resultar en una alta mortalidad (Jordan, 1990).

En el caso de las vacunas vivas es importante asegurarnos que la vacuna no sufra de shock térmico al preparar la suspensión del liofilizado/diluyente, así como evitar que la vacuna se caliente durante su aplicación (Antillon, 2005).

Se ha desarrollado una vacuna específica para utilizar en parvadas de aldeas en los países tropicales basada en la cepa V4 Australiana, seleccionada por su termoestabilidad (OIE, 2004). El método de administración recomendado es en alimento peletizado recubierto. Las pruebas iniciales, tanto de laboratorio como de campo, sugerían que este método era eficaz, pero estudios posteriores han reportado problemas, probablemente relacionados al tipo de alimento utilizado como vehículo (Alexander, 2003); ésta cepa replica en el aparato respiratorio e intestinal.

Debido a que las vacunas convencionales se deterioran si no se mantienen a una temperatura adecuada (FAO, 2003) se ha desarrollado la vacuna termoestable I2 específicamente diseñada para vacunar parvadas en aldeas, se recomienda la aplicación de esta vacuna por gota ocular (OIE, 2004). Se ha demostrado la eficacia de las vacunas termoestables I2 y V4HR bajo las condiciones de Mozambique con resultados estimulantes (Young et al, 2000). La cepa V4HR resultó ser más inmunogénica y protectora que la cepa La Sota, la mejor ruta de administración fue la gota ocular y se logró la protección del 62.8% después de la administración vía alimento (Nwanta et al, 2005).

c. Ventajas y Desventajas de las Vacunas a Virus Vivo

Las vacunas vivas son comercializadas generalmente a partir de líquido alantoideo de huevos embrionados o de cultivos celulares infectados en forma de polvo seco congelado, son

relativamente baratas y de fácil aplicación, y permiten la aplicación en masa (OIE, 2004; Alexander, 2003). La inmunidad local se ve estimulada por la infección con los virus vivos, y la protección ocurre rápidamente después de la aplicación. Los virus vacunales se pueden diseminar a partir de aves que han sido vacunadas adecuadamente a otras en donde la vacunación no fue efectiva (Alexander, 2003), lo que se traduce como una mayor uniformidad de vacunación (Comotto, 2000). Una ventaja de la vacuna termoestable I2 es que se ha hecho disponible para la producción local en países no industrializados, lo que tiene la ventaja significativa de un bajo costo (Alexander et al, 2004).

Existen algunas desventajas, la más importante es que la vacuna puede ocasionar la enfermedad, dependiendo de las condiciones ambientales y la presencia de otras infecciones. Por lo tanto es importante utilizar virus extremadamente suaves para la primovacunación y, como consecuencia, por lo general se requieren múltiples aplicaciones de vacuna(s) (Alexander, 2003). Su efecto protector es corto (12-15 días), lo cual es otro factor que exige revacunaciones (Antillón, 2005). La inmunidad materna puede interferir de manera negativa en la primovacunación con vacunas vivas. Aunque la habilidad del virus vacunal para diseminarse dentro de la parvada puede ser una ventaja, la diseminación a parvadas susceptibles, especialmente en granjas con animales de distintas edades puede ocasionar serios problemas, particularmente si se produce una infección concomitante con organismos que exacerben la enfermedad. Las vacunas vivas pueden ser inactivadas fácilmente por químicos y calor, y si no existe un control riguroso durante su producción, pueden estar contaminados con otros virus (Alexander, 2003). La vacunación por aspersión de pollos BB de un día puede fallar ocasionalmente en proveer una total inmunidad protectora debido a limitaciones técnicas (Mo et al, 2004).

6.2.4. Vacunas Inactivadas

a. Métodos de Producción

Las vacunas inactivadas son por lo general producidas a partir de fluido alantoideo infectivo tratado con β -propiolactona o formalina para matar al virus y luego ser mezclado con un adyuvante. Las primeras vacunas inactivadas utilizaban adyuvantes a base de hidróxido de aluminio, pero el desarrollo de las vacunas oleosas demostró un mayor adelanto. Distintas vacunas oleosas varían en su formulación de emulsificantes, antígenos y relación agua – aceite, aunque la mayoría ahora utiliza aceite mineral (Alexander, 2003). La inmunogenicidad de estas vacunas puede variar considerablemente con el tipo y la relación de los componentes de la vacuna (Jordan, 1990). La consideración más importante al seleccionar la semilla para la preparación de vacunas inactivadas es la cantidad de antígeno producido cuando se le propaga en huevos embrionados, raramente llega a ser costo efectivo el concentrar el virus (OIE, 2004).

Se utilizan varios virus semilla en la producción de las vacunas oleosas tales como Ulster 2C, B1, La Sota, F, Roakin, y varios virus virulentos. Los virus apatógenos logran títulos muy altos, por lo tanto, parecería innecesario arriesgarse a utilizar un virus virulento en la preparación de

vacunas para pollos (Alexander, 2003; Jordan, 1990; OIE, 2004). Recientemente cepas lentogénicas (Ulster 2C y La Sota) han reemplazado el uso de virus virulentos (King, 1999) habiéndose logrado títulos excepcionalmente altos con la cepa Ulster 2C (OIE, 2004)

Como no se da la multiplicación viral después de la administración de las vacunas inactivadas, se requiere una cantidad mucho mayor de antígeno que la de las vacunas vivas para lograr una inmunización adecuada (OIE, 2004).

Se pueden incorporar uno o más antígenos en la emulsión con vENC y las vacunas bivalentes o polivalentes podrían incluir al virus de la Bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Gumboro, virus del Síndrome de Baja Postura y el Reovirus (Alexander, 2003; King, 1999).

Vacunas oleosas emulsificadas específicas para la inmunización de palomas son preparadas a base del PPMV-1 inactivado (King, 1999; SENASA Arg, 2000).

Las vacunas inactivadas producen una inmunidad humoral elevada, uniforme y persistente (Antillon, 2005).

b. Aplicación de las Vacunas Inactivadas

Las vacunas inactivadas son administradas por inyección, ya sea intramuscular o subcutánea (Alexander, 2003) por lo que cada ave recibe una dosis estándar (OIE, 2004). Se recomienda preferentemente que los virus inactivados y emulsionados sean aplicados por vía subcutánea. La vía intramuscular, en la parte alta de la masa pectoral o en la cara interna del muslo, se recomienda sólo en aves que no están destinadas para el engorde (Antillon, 2005).

Se debe corroborar una adecuada aplicación evitando que la vacuna quede muy alta y cercana al cuello, que podría propiciar que el ave con las patas se rasque y pueda extraer parte de la misma, así como se debe verificar la presencia de cuellos mojados (Antillon, 2005).

c. Ventajas y Desventajas de las Vacunas Inactivadas

Las vacunas inactivadas son mucho más fáciles de almacenar que las vacunas vivas. Su producción es costosa, así como su aplicación debido a la labor necesaria para su inyección (Jordan, 1990). Los costos por aplicación pueden ser parcialmente disminuidos con el uso de vacunas polivalentes. Las vacunas oleosas inactivadas no se ven tan afectadas por la inmunidad maternal como las vacunas vivas y pueden ser utilizadas en pollitos BB de un día. El control de calidad de las vacunas inactivadas es por lo general difícil, y los aceites minerales pueden ocasionar problemas serios al vacunador si ocurriera la inyección accidental. Las mayores ventajas de las vacunas inactivadas son: el bajo nivel de reacciones adversas en aves vacunadas, la habilidad de poder ser utilizadas en situaciones no adecuadas para el uso de vacunas vivas, especialmente si hay la presencia de patógenos secundarios, los altos títulos de anticuerpos protectivos logrados y su larga duración (Alexander, 2003) además de el hecho que no existe diseminación viral a partir de la vacunación (OIE, 2004).

6.2.5. Programas de Vacunación

Los programas de vacunación y las vacunas pueden ser controlados por políticas del gobierno. Siempre deben estar diseñados para adaptarse a la situación prevalente de la enfermedad y otros factores, los cuales deben incluir la disponibilidad de la vacuna, la inmunidad maternal, el uso de otras vacunas, la presencia de otros organismos, el tamaño de la parvada, el tiempo de vida esperado para la parvada, disponibilidad de personal, condiciones climáticas, historial de vacunación y costo (Alexander, 2003). La duración de la inmunidad lograda dependerá del programa de vacunación elegido (OIE, 2004). Por ejemplo, los planes de vacunación utilizados en los EEUU son mucho más flexibles que los planes que se utilizan en Latinoamérica debido a que las cepas presentes en campo son en su gran mayoría cepas lentogénicas (Villegas et al, 1995).

El momento adecuado de la vacunación en pollos de carne puede ser especialmente difícil de determinar debido a la presencia de anticuerpos maternos (Alexander, 2003). Para sobreponer el efecto de los anticuerpos maternos, las aves pueden o ser dejadas sin vacuna hasta la 3ra o 4ta semana de edad o ser vacunadas al primer día para establecer la infección en algunas aves que luego diseminaran la infección a las otras según se van volviendo susceptibles, siguiendo con una revacunación 3 o 4 semanas después (Jordan, 1990; OIE, 2004). Para este tipo de aves no se considera necesario estimular una respuesta inmune de larga duración. En pollos beneficiados entre 35 y 42 días, en algunos lugares puede ser suficiente una sola vacunación. Sin embargo, si las aves son sacrificadas de 42 a 55 días de edad, se recomienda una segunda vacunación (Villegas et al, 1995). Debido a su corto tiempo de vida, los pollos de carne pueden no ser vacunados en países en donde existe un bajo riesgo de la ENC (Alexander, 2003). En zonas endémicas posiblemente uno de los mejores métodos por su seguridad es el uso de una vacuna viva B1 en combinación con una vacuna inactivada oleosa emulsionada al primer día de edad. Pollos con anticuerpos maternos que recibieron la combinación de vacunas permanecieron seropositivos y se mantuvieron protegidos al ser retados ocularmente hasta los 60 días (King, 1999; OIE, 2004).

En muchos países, las circunstancias o costumbres locales resultan en muy poca vacunación, sobrevacunación o errores en el momento de aplicación, en cualquiera de los casos existen serias consecuencias. Los problemas y la presión en la que los criadores en países tropicales en vías de desarrollo se ven envueltos pueden resultar frecuentemente en lo que se describe como "abuso de vacunas" (Alexander, 2003).

Programas de vacunación agresivos, necesarios para proveer protección en caso de brotes, podrían tener un impacto económico negativo a causa del aumento en el número de vacunas y por lo tanto en el costo de la vacunación, además de la pérdida de productividad a causa de las reacciones post vacunales (Swayne, 2003a).

La vacunación de reproductoras pesadas y gallinas de postura comercial siempre requiere más de una dosis de vacuna para mantener la inmunidad a través de toda su vida (Alexander, 2003) y por lo general se inicia a partir de la 3ra semana de vida. Las vacunaciones se deben

realizar a intervalos de tiempo suficientes para mantener una inmunidad adecuada (OIE, 2004). Generalmente se deben utilizar un mínimo de tres vacunas a virus vivo durante la época de crianza y desarrollo (Villegas et al, 1995). Los programas de vacunación por lo general utilizan cepas de vacunas vivas ligeramente más patogénicas a la utilizada inicialmente para potenciar la inmunidad. (OIE, 2004). Las vacunas vivas van seguidas de una vacuna inactivada aplicada antes de la producción (Villegas et al, 1995). Las cepas vivas más patogénicas pueden también utilizarse después de la vacunación con vacunas oleosas inactivadas (OIE, 2004) En ponedoras comerciales es común la aplicación de vacunas a virus vivo durante la producción, con el objeto de aumentar los niveles de anticuerpos y evitar bajas de postura debido a la infección con el virus (Villegas et al, 1995). Sin embargo, incluso títulos altos pueden no prevenir algún grado de replicación ante el desafío viral y puede ocurrir una pérdida en la producción de huevos significativa en lotes con títulos pre-desafío tan altos como 1:256 (Alexander, 1998).

Se han planteado dos programas de vacunación tipo para ser aplicados según la circunstancia de la enfermedad local (OIE, 2004):

- Para enfermedad leve o esporádica
 - Día 1: Vacuna viva Hitchner B1 por aspersión o administración conjuntival
 - Día 18 a 21: Vacuna viva Hitchner B1 o La Sota vía agua de bebida
 - Semana 10: Vacuna viva La Sota vía agua de bebida
 - Inicio de postura: Vacuna inactivada oleosa.

- Para enfermedad severa o muy diseminada
 - Día 1: Vacuna viva Hitchner B1 por aspersión o administración conjuntival
 - Día 18 a 21: Vacuna viva Hitchner B1 o La Sota vía agua de bebida
 - Día 35 a 42: Vacuna viva La Sota vía agua de bebida o aspersión
 - Semana 10: Vacuna inactivada oleosa o vacuna viva cepa mesogénica
 - Inicio de postura: Vacuna inactivada oleosa

6.2.6. Interpretación Serológica de la Respuesta Vacunal

La respuesta inmune para la ENC se estima por lo general por los títulos obtenidos por HI. Es difícil predecir los títulos a obtenerse y su relación con el grado y la duración de la inmunidad para cualquier parvada y programa de vacunación determinada. Se han presentado predicciones sobre la respuesta en pollos jóvenes vacunados al reto con vENC altamente virulentos (Alexander, 2003).

Para iniciar un proceso de interpretación serológica adecuado, se requiere del establecimiento de una base de datos que sea representativa de las poblaciones que van a ser objeto de análisis (Muñoz, 2004). Para evaluar el proceso de inmunización es importante realizar pruebas de HI en forma práctica y rutinaria de la siguiente manera (Antillon, 2005):

- ✓ Pollos de carne: a las 4 y 6 semanas de edad
- ✓ Pollitas en levante: a las 4, 10, 14 y 18 semanas de edad
- ✓ Pollas en postura: evaluar cada 1 o 2 meses según zona.

Cuando se utilicen los títulos HI para medir la respuesta vacunal, se recomienda utilizar una cepa avirulenta (V4 o Ulster 2C) como antígeno viral. El antígeno La Sota ha demostrado ser no recomendable para este propósito cuando la vacunación ha sido realizada con esta cepa ya que resulta en una sobre estimación de los anticuerpos protectivos en los títulos serológicos (Alexander et al, 2004).

La serología es una herramienta adicional en el programa de medicina preventiva y se le debe tomar como una herramienta dinámica (Muñoz, 2004). Los niveles de anticuerpos son una buena guía para conocer el estado inmunológico de un lote de aves. Los títulos observados en la prueba de HI son bastante variables entre los diferentes laboratorios pues dependen de la cantidad de antígeno utilizado y de la forma como se lea la prueba, lo mismo que de otros factores. Por lo tanto, las cifras de promedios geométricos que se indican a continuación pueden ser difíciles de comparar con cifras provenientes de otros laboratorios. Esto no ocurre con las cifras de los títulos ELISA que generalmente tienden a ser más uniformes (Villegas et al, 1995).

En animales de larga vida los niveles de anticuerpos a edad temprana varían de acuerdo con el programa de vacunación aplicado en las madres. Se pueden observar títulos ELISA de 5,000 o más en aves de un día de edad (títulos HI de aproximadamente 80). Después de dos vacunaciones, los títulos ELISA se encuentran en aproximadamente 3,000 y los títulos HI son bajos (promedios de 10 a 15). Antes del período de producción, los títulos ELISA pueden estar entre 5,000 y 7,000 y los promedios HI entre 10 y 20. Después de la aplicación de la vacuna inactivada, los niveles de anticuerpos se incrementan considerablemente, dependiendo del tipo de vacuna utilizada (Villegas et al, 1995).

En áreas de bajo desafío, en donde se utilicen vacunas vivas tipo B1B1 y La Sota, los títulos en las reproductoras no alcanzan niveles superiores a 2,500 y sus rangos podrían estar entre 1,200 a 2,500 con la aplicación de dos vacunas vivas en campo; estos títulos podrían tener un rango más reducido después de una revacunación adicional antes de las 10 semanas de edad. Los rangos de títulos podrían disminuir y los niveles ser más elevados en el caso que aumentara el desafío viral (Muñoz, 2004).

Cuando se realizan monitoreos 4 semanas después de la aplicación de vacunas inactivadas, se encontrará que los coeficientes de variación (CV) son más reducidos y los niveles de anticuerpos son más estables alrededor de los 3,500, con un desplazamiento ligero de los histogramas hacia la derecha de la gráfica en comparación a los histogramas que han resultado del programa de vacunación con las vacunas vivas. Los resultados tienden a dibujar una campana de Gauss con una distribución poblacional más uniforme. Si se presentara un desafío, el histograma comenzará a moverse marcadamente a la derecha con CV muy reducidos de menos de 30% y paulatinamente los títulos de referencia más altos serán dramáticamente

superiores, en niveles de 12,000 a 25,000 de acuerdo con la respuesta inmune de la parvada con respecto al programa de vacunación. Si el programa con vacuna inactivadas está trabajando bien, posiblemente los títulos no consigan niveles de 12,000 a 15,000, pero si el virus se encuentra circulando y realizando un proceso sistémico, los títulos podrían llegar a ser más elevados, entre 20,000 y 25,000, pero siempre correlacionados con las manifestaciones clínicas y la pérdida de producción (Muñoz, 2004).

En pollos que son vacunados con una vacuna B1 se presentan bajos niveles de anticuerpos durante toda su vida. Los títulos ELISA al beneficio varían entre 1,000 y 1,500 y los promedios geométricos de HI son menores de 10. Lotes vacunados dos veces (B1 y La Sota) muestran niveles de anticuerpos ELISA de 1,500 a 3,000 y promedios geométricos HI de 10 a 15. Títulos ELISA mayores a 5,000 generalmente están relacionados con reacciones respiratorias fuertes donde los promedios geométricos HI son mayores de 15 (Villegas et al, 1995).

En pollos de carne en áreas de bajo desafío, al realizar los monitoreos a los 35 días de edad o al beneficio, los títulos van a estar por debajo de 1,000 y si comienzan a elevarse, habría que tratar de investigar si están relacionados con una pobre aplicación de la vacuna, inmunosupresión, o mala calidad del pollo BB, entre otros factores; que resulten en una reacción en cadena de la misma vacuna y por ende en una elevación de los títulos, los cuales son producto de los virus vacunales, mas no de un virus de campo; estos títulos podrían estar entre 5,000 a 7,000. De esta manera se podrían aclarar muchas de las elevaciones de títulos de ELISA para la ENC cuando realmente no se esta observando una sintomatología clara de la enfermedad, pero si un constante ruido respiratorio (Muñoz, 2004).

En zonas donde el desafío esta presente de manera regular, se podría observar que los histogramas muestran distribución desuniforme, pero cuando se aplican vacunas inactivadas los títulos podrían ser similares pero con curvas de Gauss más uniformes. Se consideran como buenos coeficientes de vacunación para vacunas vivas entre 40-60% mientras que para vacunas inactivadas entre 30-40% (Muñoz, 2004).

Como ya se mencionó, los títulos serológicos variarán según la cantidad de antígeno utilizado en la prueba, los siguientes valores consideran 4 unidades de HA de virus (Alexander, 1998); sin embargo se pueden utilizar valores entre 4 y 10 unidades de antígeno (Villegas, 2003). Para todos los serotipos de paramixovirus aviares, aves que no han sido inmunizadas o infectadas por lo general se obtienen títulos HI menores a 1:8, y títulos no específicos sobre este nivel son raros para la mayoría de especies aviares (Alexander, 1998).

En términos generales, títulos en el nivel más bajo de aquellos mesurables positivos pueden proteger contra la muerte en infecciones no complicadas. Con la mayoría de las vacunas vivas lentogénicas se obtienen títulos en la prueba de HI de 1:16 a 1:64 (2^4 a 2^6) después de una única aplicación. La vacunación repetida con vacunas similares o más virulentas pueden incrementar la respuesta inmune considerablemente, y en programas que incluyen vacunas inactivadas emulsionadas los títulos tan altos como 1:1024 o 1:4096 (2^{11} o más) son comunes (Alexander, 1998; Alexander 2003).

Se determinó que las aves están protegidas contra la muerte cuando tienen un título mínimo de 1:32 o 5 log₂ (Muñoz et al, 2002).

Para el cálculo de los promedios de los títulos cuando los resultados se encuentran expresados en la escala del log₂ la siguiente tabla puede servir como guía (Villegas, 2003):

Log ₂	Título
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128

Es necesario recordar, que si bien los anticuerpos son un buen reflejo de la protección del ave contra la ENC, existen otros factores de resistencia, así como de la inmunidad local y celular y fenómenos de interferencia viral que coadyuvan en este proceso. Aves con títulos bajos pueden resistir a un desafío y aves con títulos elevados pueden sucumbir a este (Muñoz et al, 2002)

6.2.7. Vacunación de otras Aves de Corral

Aunque el desarrollo de las vacunas fue principalmente para pollos, estas pueden ser utilizadas efectivamente en otras especies, aunque puedan haber algunas diferencias aparentes en la respuesta. Por ejemplo, los pavos por lo general muestran una menor respuesta, y como resultado, son vacunados inicialmente con la cepa La Sota seguido de una vacuna oleosa. Sin embargo existe evidencia que La Sota puede ocasionar reacciones en el tracto respiratorio, y que la vacunación por aerosol con virus lentogénicos ocasiona lesiones patológicas en la traquea. Aún se están realizando investigaciones sobre los programas de vacunación para pavos utilizando vacunas vivas e inactivadas (Alexander, 2003).

Gallinas de Guinea y perdices han sido vacunadas satisfactoriamente con vacunas con cepa La Sota y/o vacunas oleosas. Aún se siguen realizando investigaciones para determinar las vacunas y los programas más adecuados para palomas a causa de la panzootia ocurrida en estas aves en la década de los 80s (Alexander, 2003).

La vacunación de avestruces y otras ratites no esta tan bien entendido como en otras aves de corral, pero se han sugerido dosis y programas (Alexander, 2000).

6.2.8. Desarrollos a Futuros

La tecnología de reversión genética ha permitido la manipulación genética de genomas no segmentados de virus ARN con sentido negativo (Mebatsion et al, 2001). La tecnología de la biología molecular ha permitido mucho mayor entendimiento de la patogenicidad y la antigenicidad del vENC y ha permitido la clonación de los genes más estrechamente relacionados. Grupos de investigadores en esta área han reportado inmunización protectora con

el gen HN expresado en el poxvirus aviar recombinante y células aviares recombinantes; o el gen F expresado en el poxvirus aviar recombinante, virus de la vaccinia, poxvirus de palomas, y herpesvirus de pavos o ambos HN y F expresados en poxvirus aviar (Alexander, 2003; OIE, 2004). Se ha aprobado el uso de varias de estas vacunas recombinantes en algunos países (OIE, 2004). Dos vacunas recombinadas han sido autorizadas en los EEUU. Ambas vacunas usan el virus de viruela aviar (poxvirus) atenuado como vector para HN e injertos de genes de la proteína F, los injertos de genes fueron clonados de diferentes cepas de vENC. Una de las vacunas incorpora el HN y el gen F de una cepa lentogénica B1 y el otro incorpora los genes de la cepa velogénica Texas GB. Existen ventajas potenciales para el eficaz uso de vacunas que expresan solamente el HN y las proteínas F en lugar del antígeno completo del vENC. Por ejemplo, el monitoreo serológico puede ser configurado para diferenciar aves vacunadas de aquellas que han sido infectadas, una característica que sería particularmente útil si las vacunas recombinadas fueran utilizadas como un componente de los programas de erradicación. Así mismo, el uso de este tipo de vacunas reduciría el uso de vacunas a base de virus lentogénicos, el patotipo de aislamiento de campo usualmente recuperado de pollos y pavos con dificultades respiratorias en los EEUU y Canadá. El costo y los requerimientos de administración individual en lugar de una administración masiva son los factores que limitan el uso de este tipo de vacunas por el momento. Vacunas recombinadas similares utilizando herpes virus de pavo como vector para el HN y el gen F del vENC han sido estudiados experimentalmente pero no han recibido autorización para su uso comercial (King, 1999). Aunque desde hace algún tiempo existen vacunas recombinantes comercialmente, su uso ha sido muy limitado debido al alto costo comparado con las vacunas convencionales. Basándose en el precio actual de la carne de pollo y huevos, la industria no puede permitirse utilizar una vacuna cara incluso si es altamente efectiva y superior a las convencionales. Otra preocupación sobre las vacunas recombinantes ha sido que la inmunidad generada contra el virus vector después de la vacunación inicial podría prevenir el uso subsecuente de la misma vacuna o una similar como un agente inmunizador en el mismo animal (Tripathy, 2002).

También se ha creado una vacuna con marcador de subunidades efectivo utilizando baculovirus recombinantes que contienen los genes HN y F de cepas velogénicas viscerotrópicas y lentogénicas del vENC. Esta vacuna ha logrado inducir una protección completa sobre los signos clínicos y mortalidad así como una significativa reducción de la eliminación viral después de una sola aplicación, lo que la convierte como buena candidata para programas de erradicación en el futuro (Lee et al, 2005).

En vista que la vacunación in ovo ha demostrado ser efectiva y económica para la aplicación de diversas vacunas utilizadas comúnmente, se ha evaluado la tecnología in ovo para la aplicación de vacunas contra la ENC. Se ha descrito el uso de vacunas vivas modificadas, pero esto implica la utilización de agentes químicos mutagénicos en la preparación de la vacuna, también se han evaluado las vacunas recombinantes en pollos SPF, sin embargo no existen datos sobre la eficacia de estas vacunas en pollos comerciales con presencia de anticuerpos

maternales, lo que podría afectar la efectividad de las vacunas vivas (Mebatsion et al, 2001). Un nuevo acercamiento en el desarrollo de vacunas basado en el complejo virus-anticuerpo ha sido desarrollado, en un reporte preliminar de una nueva vacuna in ovo que incorpora cepas vivas de B1 o La Sota complementadas con anticuerpos neutralizadores de vENC, se ha descrito la eficacia de la vacuna en pollos SPF y pollos de carne comerciales como resultado de un reto con NVND. Aún falta determinar las ventajas del uso de este tipo de vacuna (King, 1999; Nagaraj et al, 2004). Basándose en el hecho que la proteína V del vENC tiene una función dual, jugando un rol directo en la replicación viral y como factor de virulencia, y gracias a técnicas de reversión genética se ha demostrado el potencial de uso de vacunas recombinantes con defectos de edición de esta proteína como vacunas seguras para embriones, lográndose vacunas que poco afectan la incubabilidad y confieren altos títulos de anticuerpos específicos que son altamente protectivos (Mebatsion et al, 2001). Existe actualmente al menos una vacuna viva comercial contra la ENC (Newplex™) para ser aplicada en embriones de pollos de carne de 18 días (Mo et al, 2004).

Se ha desarrollado una vacuna bivalente contra la IBD y la ENC, la cual fue preparada con la mezcla de virus con anticuerpos contenidos en las yemas de huevos hiperinmunes, la eficacia de esta vacuna fue medida en la presencia de anticuerpos maternales y se pudo determinar la protección de las aves vacunadas al ser expuestas a ambos virus (vENC y vIBD) (Mousa, 2002).

Un paso adelante en el desarrollo de una vacuna comestible segura y efectiva contra la ENC ha sido la exploración de plantas genéticamente diseñadas para expresar proteínas virales. Se ha reportado la construcción de plantas de papa que expresan los genes que codifican las proteínas inmunogénicas del vENC. Se ha probado el extracto de la planta en ratones, obteniéndose la producción de anticuerpos específicos contra vENC (Berinstein et al, 2005).

Se espera también que el vENC pueda ser utilizado como una vacuna vector para la entrega de antígenos al sistema inmune (Peeters et al, 1999). Así mismo se ha generado una vacuna recombinante del vENC que expresa una hemaglutinina del virus Influenza, induciendo una respuesta humoral fuerte contra influenza y proveyendo una completa protección contra dosis letales, demostrando una vez más el potencial del vENC recombinante como una vacuna vector (Nakaya et al, 2001).

El vENC es también considerado un potencial agente oncolítico ya que puede matar efectivamente y selectivamente células tumorales (Park et al, 2003). El interés científico en terapias con el vENC esta tomando importancia debido a esta propiedad y existe una posibilidad de generar virus recombinantes que puedan facilitar el desarrollo de una terapia segura y efectiva para el tratamiento de cáncer en humanos y animales (Mebatsion, 2001).

6.3. Tratamiento

No existe tratamiento conocido capaz de modificar favorablemente el curso de la enfermedad, sin embargo, es indispensable la administración de vitaminas y antibióticos para

controlar las complicaciones infecciosas (Comotto, 2000) y debe de realizarse exclusivamente en infecciones con cepas suaves (Hoerr, 2004).

VII. La Enfermedad de Newcastle en Aves Silvestres

La mayoría de la información disponible sobre la ENC se refiere a aves comerciales, principalmente a pollos y gallinas. Sin embargo debido a la importancia que tienen las aves silvestres, no sólo por actuar como reservorios del virus o por su rol epidemiológico en la transmisión y diseminación de la enfermedad, sino también por la importancia de preservación de la fauna; creímos conveniente referirnos los aspectos relacionados a la ENC en este tipo de aves de manera independiente resaltando las diferencias que presenta la enfermedad en lo referente al cuadro clínico, patología, tratamiento, diagnóstico y control de la enfermedad.

Los virus aislados de aves silvestres por lo general son de baja virulencia por lo que se sugiere que la presencia de virus virulentos en aves en cautiverio se deba probablemente a que estas se infectan después de haber sido atrapadas. Además el mantenimiento de un virus virulento en cualquier especie de ave silvestre parece poco probable debido al efecto que dicha infección podría tener en la sobrevivencia del animal. Es poco probable que las infecciones demostradas en aves en cautiverio importadas resulten de infecciones enzoóticas en aves silvestres en sus países de origen. Se considera que dichas infecciones probablemente se originen en los establecimientos en donde se mantienen estas aves antes de la exportación, ya sea como resultado de vENC enzoótico en dichas estaciones o por diseminación a partir de aves de corral cercanas, como podría ser el caso de aves de traspatio (Alexander et al, 2004).

Recientemente se realizó la caracterización biológica y molecular de aislamientos del vENC en aves silvestres criadas como mascotas (paloma, perico, loro y periquito) en donde todas las cepas fueron identificadas como velogénicas (Senthuran et al, 2005).

El movimiento de aves exóticas fue decisivo en la expansión del brote de California en 1971. A raíz de este hallazgo se encontró que varias especies de aves, particularmente los pericos

pueden sufrir de infecciones al VVND hasta por un año (King, 1999). Antes de 1990, la enfermedad había sido raramente reportada como causa de mortalidad en aves de vida libre en los EEUU y Canadá. En el brote de 1990 en Canadá murieron más de 10,000 aves de vida libre, básicamente todos fueron cormoranes, y en los EEUU se consideró que en 1992 murieron 20,000 aves de vida libre a causa del vENC (Docherty et al, 2001).

Basándose en la secuencia de las proteínas F y M se determinó que los virus que afectaron a los cormoranes entre 1995 y el 2000 estaban relacionados con cepas de origen en aves psitácidas y a virus aislados en el brote de la década de los 70s en California. Las cepas aisladas de cormoranes podrían representar un nuevo genotipo o un subtipo dentro del genotipo V representando un vENC de genotipo indígena presente en aves silvestres de vida libre en Norteamérica, específicamente en aves acuáticas (Weingartl et al, 2005).

Aún cuando el vENC tiene menor capacidad de infectar en forma natural a aves silvestres, posee la capacidad de adaptarse a nuevos huéspedes a los que no sólo infecta sino que puede causar mortalidades considerables (Estudillo, 2000). En el brote de 1992 en cormoranes se estiman mortalidades de hasta 90% (Docherty et al, 2001). En términos generales las aves silvestres son mucho más resistentes al vENC que los pollos domésticos (Estudillo, 2000) y si bien se infectan, mayormente no presentan signos clínicos (Kitching, 2004). Se consideran como las especies más susceptibles a aquellas que tienen una estrecha relación filogenético con el pollo, como las del orden Galliforme y las especies más resistentes parecen ser las acuáticas (Vargas, 2003).

Cuadro N° 10: Susceptibilidad de distintos órdenes de aves a la ENC

ORDEN	SUSCEPTIBILIDAD
Struthioniformes (Corredoras)	Moderada
Cariamiformes (Chuña)	Baja – Alta
Gruiformes (Grulla)	Latencia
Ralliformes (Rascón)	Latencia
Lariformes (Gaviota, Gaviotín)	Baja
Sphenisciformes (Pingüino)	Baja – Alta
Pelecaniformes (Pelicano)	Baja
Columbiformes (Paloma, Tórtola)	Baja – Moderada - Alta
Psittaciformes	
Agapornis	Baja – Alta
Guacamayo, Cotorra	Alta
Amazona	Alta
Lorito	Moderada
Mérqulo	Alta
Loro ecléctico	Moderada
Lori	Refractaria
Perico	Latencia
Periquito australiano	Baja – Alta
Cacatúa	Alta
Cocatil	Moderada
Strigiformes (Búho)	Latencia – Baja – Alta
Falconiformes (Halcón)	Baja – Moderada
Accipitriformes (Buitre, Aguilucho)	Baja – Moderada
Sagittariiformes (Secretario)	Baja

Ciconiformes (Cigüeña)	Baja
Anatiformes	
Ganso	Latencia – Moderada
Patos de superficie	Latencia
Patos de la bahía	Latencia
Phasianiformes	
Gallina de Guinea	Moderada
Pavo Real	Alta
Faisán	Alta
Urogallo	Latencia – Alta
Cuculiformes (Cuco)	Latencia
Upupiformes (Toco)	Baja – Moderada
Alcediniformes (Martín pescador)	Baja
Piciformes (Tucán)	Baja
Passeriformes	
Cuervo	Latencia – Moderada
Pinzón	Latencia – Baja
Diablito	Latencia – Alta – Baja
Otros	Latencia – Alta – Moderada

Fuente: Gerlach, 1994

Pareciera que el incremento en virulencia de los vENC para algunas especies de aves acuáticas ha ocurrido concurrentemente con la emergencia de nuevos genotipos que han evolucionado en áreas ecológicas y geográficas particulares (Liu et al, 2005).

7.1. Enfermedad Clínica y Patología

La diferenciación de las cepas del vENC según su patogenicidad (velogénico, mesogénico y lentogénico) son sólo aplicables a los pollos domésticos. La patogenicidad es especie-específica y varía considerablemente en infecciones experimentales en otras especies, incluso entre dos especies del mismo género (Gerlach, 1994) por lo que dicha clasificación no es transferible directamente a aves silvestres. Estudios experimentales han demostrado diferencias en la respuesta de aves a la misma cepa viral (Docherty et al, 2001).

Diversas presentaciones clínicas son características, pero pueden variar considerablemente en su severidad, estas se pueden resumir como (Gerlach, 1994):

- Muerte peraguda: Varias horas de depresión causadas por la viremia.
- Enfermedad gastrointestinal aguda (VVND): Diarrea verdosa voluminosa acompañada de anorexia, letargia y cianosis.
- Enfermedad respiratoria aguda: Exudado en el tracto respiratorio superior, estertores y disnea.
- Enfermedad gastrointestinal y respiratoria aguda.
- Enfermedad Crónica del Sistema Nervioso Central (CNS): Opistótomos, tortícolis, temores y parálisis tónico-clónica de los miembros.

Los signos de la CNS por lo general ocurren con el desarrollo de los anticuerpos humorales y pueden ocurrir después de una infección aguda o subclínica de la enfermedad. Los virus pueden no ser recuperados una vez que se inician a desarrollar los signos de la CNS. La

inmunidad parcial puede alterar la progresión clínica y las lesiones patológicas de la enfermedad (Gerlach, 1994).

Las aves afectadas típicamente presentan petequias en la superficie de las serosas, tejido graso y en la mucosa de la laringe, tráquea y proventrículo. También se pueden observar hemorragias en los folículos ováricos en casos prolongados. Con cepas virulentas es común encontrar enteritis hemorrágica necrotizante, mayormente en el yeyuno. El tejido linfoide asociado con las lesiones hemorrágicas forman "botones" los cuales son lesiones patognomónicas en Phasianiformes (Gerlach, 1994), las cuales pueden ser diagnósticas para este orden de aves en la ausencia de evidencia epizootica de Influenza aviar (Okoye et al, 2000). Aves con signos de la CNS pueden no presentar lesiones macroscópicas o podrían presentar hiperemia en el cerebro (Gerlach, 1994).

Las lesiones microscópicas son tan variables como los signos clínicos. Las lesiones de la CNS por lo general se caracterizan por una encefalitis no purulenta con infiltrado vascular y perivascular de células mononucleares. Puede ocurrir también el incremento de las células de glia y pseudoneuronofagia. Las lesiones histológicas raramente se correlacionan con la severidad de los signos clínicos (Gerlach, 1994).

En psitácidas, pichones y palomas la enfermedad suele cursar en forma asintomática (Monroy, 2000). Papagayos amazónicos que son portadores asintomáticos de la enfermedad son capaces de propagar el virus durante más de 400 días (APHIS, 2003).

Se realizó un estudio experimental inoculando tórtolas adultas (*Eupelia cruziana*) con una cepa velogénica viscerotrópica del vENC lográndose reproducir la enfermedad, en donde se encontró que el 40% de las aves presentó signos clínicos, los cuales fueron sólo de tipo nervioso (tremores en la cabeza, torción del pescuezo e incoordinación). La mortalidad fue del 20% y se observaron lesiones macroscópicas sólo a nivel del sistema nervioso, a la histopatología se observaron lesiones en el cerebro (satelitosis, gliosis, neuronofagia, degeneración neuronal y edema), además de lesiones de tipo respiratorio en tráquea (pérdida ciliar, atrofia epitelial) y pulmón (hiperemia). Se registró un incremento en los títulos HI de las aves (Promedio Geométrico (PGT) =12.1) a los 21 días luego del cual se inició el descenso de los mismos (Vargas, 2003). En otro estudio donde se inocularon palomas (*Columba livia*) con un virus VVND de un brote de campo se pudo observar animales con descarga nasal, estornudos y diarrea a partir de los 5 días post desafío además de signos nerviosos (tremores, opistótomos y tortícolis). La morbilidad obtenida fue del 58% y la mortalidad de 38%. Los niveles de anticuerpos se elevaron a partir de la primera semana post inoculación, alcanzando su pico (PGT=2) en la segunda semana y llegando al nivel más bajo a la quinta semana (Caballero, 2003).

7.2. Diagnóstico

Para el diagnóstico diferencial se deben considerar todas las causas infecciosas y no infecciosas de enfermedades gastrointestinales y respiratorias. Un factor importante para la

diferenciación es que la ENC no se encuentra asociada con sinusitis. Las lesiones de la CNS son típicas para la ENC en una variedad de especies aviares. Como regla, el tiempo de incubación en estos casos es prolongado, y las lesiones histopatológicas pueden ser difíciles de documentar. Pueden observarse signos clínicos comparables con clamidiosis (meningitis), salmonelosis (encefalitis purulenta), encefalomalacia, intoxicación por plomo y deficiencias de calcio (Gerlach, 1994). En el caso de Psitácidas deben tenerse en cuenta para el diagnóstico diferencial la psitacosis y la enfermedad de Pacheco del papagayo (OIE, 2002; SENASA, 2004). La diferenciación histopatológica sólo es posible después de la examinación exhaustiva de una variedad de tejidos afectados (Gerlach, 1994).

Se puede realizar el diagnóstico ante mortem de la ENC por medio de cultivo viral a partir de heces o descargas respiratorias (obtenidas por hisopados) de aves afectadas (Gerlach, 1994). En el caso de aves muy pequeñas y delicadas que puedan ser dañadas con el hisopado, se pueden recolectar heces frescas como alternativa (OIE, 2004). El número de muestras requeridas para el diagnóstico dependerá del tamaño de la parvada, los signos clínicos (CNS) y la situación de cuarentena (Gerlach, 1994).

Las muestras postmortem para el aislamiento viral deben incluir traquea, pulmón, bazo, hígado y cerebro embalados en un medio de transporte refrigerado. Tejidos fijados de cerebro y traquea pueden ser utilizados para histopatología. Secciones criocongeladas de la mucosa nasal o traqueal pueden ser procesadas para la coloración con anticuerpos fluorescentes aunque pueden ocurrir reacciones no específicas. Se puede colectar humor acuoso para HA (para detectar el virus) y para HI (para detectar anticuerpos contra el virus) y puede proveer el diagnóstico más rápido (de horas a días) si contiene la suficiente cantidad de antígeno presente en la muestra (Gerlach, 1994).

La demostración directa del virus puede lograrse a partir de heces, hisopados cloacales o descargas del tracto respiratorio. El aislamiento viral es necesario para una clasificación completa del virus. La habilidad del vENC para adaptarse a una variedad de sistemas en los huéspedes puede hacer difícil una demostración directa. El hecho que aves infectadas latentemente tengan títulos virales bajos y que puedan estar presentes cepas vacunales (incluso cepas mesogénicas en aves importadas o aves migratorias) complican la evaluación de los aislados virales. Los aislamientos que se determinan como APMV-1 por HI deben ser enviados a laboratorios especializados para su diferenciación. La caracterización específica puede ser obtenida con MABs y por la determinación de la virulencia en pollos (MDT, ICPI, IVPI o formación de placa) (Gerlach, 1994).

La demostración indirecta del virus se logra mediante la evaluación de la respuesta humoral a los antígenos virales. La producción de anticuerpos varía tanto con los grupos taxonómicos como con la respuesta individual, por lo tanto, la demostración indirecta del virus puede ser dificultosa. Se pueden observar títulos altos por HI alrededor del cuarto día post infección y pueden variar considerablemente. Los títulos pueden ser inexistentes o bajos (aves de caza, palomas domesticas y periquitos australianos), incluso en aves que han sobrevivido a la

enfermedad. El desarrollo de anticuerpos detectables por HI podría retrasarse, e infecciones latentes pueden resultar en la formación de anticuerpos. Los títulos por HI que desarrollan las Psitaciformes pueden ser bajos en los Amazonas y en las Psitaculidae, teniendo títulos promedio de 1:8 a 1:64 mientras que las cacatúas pueden llegar a tener títulos de 1:320 (Gerlach, 1994).

Las pruebas diagnósticas basadas en técnicas moleculares para identificar y caracterizar agentes son especie-específicas (y por lo mismo no funcionan en animales no domésticos) lo que podría resultar en la no detección por pruebas convencionales del agente, la habilidad para desarrollar nuevas pruebas diagnósticas es crítica para el éxito (Rideout, 2004).

7.3. Tratamiento

Se puede utilizar suero hiperinmune (2 ml/Kg. de peso vivo por vía IM) para proteger a aves expuestas pero no ofrece ningún beneficio una vez que los signos clínicos están presentes. Los signos de la CNS ocurren en presencia de anticuerpos humorales. El uso de vitaminas del complejo B y anticonvulsivos para el tratamiento de encefalitis no purulenta inducida por el vENC es desalentador; en estudios controlados, no se encontró diferencia entre los grupos tratados y los grupos control. Después de la mejoría del ave infectada (que puede tomar un año), cualquier situación estresante puede ocasionar convulsiones severas o temores (Gerlach, 1994).

7.4. Control

La ENC ocurre a nivel mundial y muchas aves silvestres pueden funcionar como portadores. Regímenes de vacunación serán efectivos en controlar infecciones en aviarios, granjas reproductoras y colecciones de zoológicos; sin embargo, siendo la ENC una enfermedad de notificación obligatoria en la mayoría de países, regulaciones gubernamentales podrían controlar los protocolos de vacunación (Gerlach, 1994).

La mayoría de aves dentro de órdenes distintos al de las Phasianiformes deben ser vacunadas parenteralmente para obtener una respuesta efectiva mediada por anticuerpos. Las vacunas inactivadas producidas para pollos son útiles, asumiendo que las leyes permitan su utilización. Las vacunas oleosas han demostrado ocasionar abscesos en las áreas alrededor del sitio de inyección en algunas aves y deben ser utilizadas con precaución. Los abscesos secundarios a una inyección subcutánea son más fáciles de tratar que los ocurridos después de una inyección intramuscular (Gerlach, 1994).

Se ha demostrado que faisanes vacunados (vacuna viva e inactivada) pueden infectarse con virus velogénico y diseminarlo a través de la ruta respiratoria sin mostrar ningún signo de enfermedad. Estos resultados resaltan las importantes implicancias que la aplicación de biológicos podría tener sobre la salud en la avifauna y que deben ser tomados en consideración (Catelli et al, 2005).

Las vacunas vivas producidas para pollos (y utilizadas en otras Galliformes) no deben ser utilizadas en otros órdenes aviares. La infectividad potencial de las cepas vacunales en un

huésped no adaptado no ha sido determinada. Vacunas administradas a Psitaciformes vía agua de bebida han demostrado no ser efectivas (Gerlach, 1994).

Como consideración general en un brote activo de la ENC, es posible la vacunación de emergencia con las cepas Hitcher B1 y La Sota (la verdaderamente apatógena) por las vías ocular o nasal a razón de cinco dosis de pollo por ave. Estas cepas funcionarían como inhibidores por competencia, y la protección local inducida no puede determinarse por un incremento de anticuerpos humorales. En un brote en una granja con aves ornamentales (con más de 2,000 aves de más de 200 especies), este método de vacunación protegió efectivamente a aves que aún no estaban clínicamente enfermas. En Gallináceas la dosificación con vacunas a virus vivo, seguida por un refuerzo tres semanas después provee inmunidad por tres a cuatro meses. Las vacunas inactivadas proveen de cinco a siete meses de inmunidad. Una vacuna viva seguida dos a tres semanas después por una vacuna inactivada puede proveer de inmunidad de nueve a doce meses, esta información no debe ser aplicada para otros órdenes de aves. Los incrementos de los títulos por HI después de la vacunación son indicativos de una respuesta por parte del huésped y pueden no correlacionarse con la inmunidad (Gerlach, 1994).

7.4. Cepa Variante de Paloma

La variante de paloma (PPMV-1) ha demostrado estar muy estrechamente relacionada con el vENC pero difiere serológicamente, bioquímicamente y patológicamente (Gerlach, 1994). Esta cepa ha sido asignada al subgenotipo VIB y es responsable de la mayoría de los brotes en palomas y tórtolas alrededor del mundo desde la década de los 80s (Liu et al, 2005).

Los MABs han demostrado que las cepas variantes de paloma recuperadas en muchos países europeos son bastante uniformes. El espectro de huéspedes incluye palomas domestica, común, torcaz, etc. Las especies sensibles (pero más o menos inaparentemente infectadas) incluyen a los Cracidae, Pavoninae, Phasianinae, mirlo común, gorrión doméstico, golondrina común, cernícalo, busardo, amazona vinosa y perico multicolor. El virus es infeccioso para los polluelos, sobretodo en individuos inmunocomprometidos. Polluelos infectados experimentalmente no se convirtieron en portadores latentes (Gerlach, 1994).

Columbriformes afectados presentaron signos clínicos no descritos anteriormente los cuales incluyen polidipsia, poliurea, anorexia, diarrea y vómitos. Estos signos agudos frecuentemente no reconocidos son seguidos por parálisis tónico clónica de las alas (más raramente de los miembros), temores de la cabeza y tortícolis. En contraste con la ENC, puede ocurrir una paresis flácida y parálisis, probablemente como consecuencia de una neuropatía periférica. Otras lesiones menos frecuentes son blefaroedema unilateral, deformación de los huevos, mortalidad embrionaria y muda distrófica. No ocurre disnea, lo cual es común en ENC. La mortalidad es mayor en pichones. Aves mayores afectadas pueden recuperarse espontáneamente dentro de las tres a cuatro semanas del inicio de los signos clínicos. Las lesiones macroscópicas incluyen hiperemia del cerebro y órganos parenquimatosos grandes,

enteritis catarral, tumefacción de los riñones y hemorragia y necrosis del páncreas. Las lesiones histológicas son variables, se pueden observar edema de las meninges y cerebro y tumefacción del endotelio vascular de los vasos de las meninges. Puede ocurrir infiltración perivascular linfocítica y desmielinización de la materia blanca en el cerebelo, diencefalo, lóbulo óptico, medula oblonga y espina dorsal. También ocurren lesiones degenerativas e inflamatorias en los nervios periféricos (Gerlach, 1994).

Para el diagnóstico se utilizan los mismos procedimientos descritos para el aislamiento del vENC. Se pueden utilizar pruebas de HI para diferenciar entre vENC y la variante de palomas. La diferenciación definitiva es posible únicamente por el uso de anticuerpos monoclonales (Gerlach, 1994).

Las cepas vacunales La Sota administradas por vía ocular o nasal no son tan eficaces en la protección como se esperaba, estas cepas replican pobremente en el tejido de palomas, por lo que se requiere de una alta dosis vacunal para la interferencia y la producción de anticuerpos (protectivos sólo por 8 a 12 semanas). La vacunación con cepas vivas puede exacerbar infecciones latentes con clamidia o herpesvirus. La administración parenteral de la vacuna viva Hitchner B1 tiene efectos secundarios similares pero puede proveer de seis meses de inmunidad. Las vacunas inactivadas son preferibles para la inmunización de palomas. En un brote activo, la vacunación con vacunas oleosas acortará el tiempo de la enfermedad y atenuará la presentación de signos clínicos. Una vez que se presentan los signos de la CNS, la vacunación no tiene ningún valor, sin embargo ocurren recuperaciones espontáneas (Gerlach, 1994).

Para la vacunación, existen comercialmente vacunas homólogas oleosas. Se requiere del refuerzo anual. Todas las aves en un almacén y grupos de palomas mensajeras destinadas a viajar para competencias deben ser vacunadas. Pichones de reproductores vacunados tres meses antes de la postura pueden no tener anticuerpos protectivos. Los pichones pueden ser vacunados con la vacuna homóloga a partir de la cuarta semana de edad. Las vacunas inactivadas del vENC proveen protección sólo por seis meses. La aplicación de la vacuna se recomienda por vía subcutánea en el cuello y para prevenir una hemorragia fatal la inyección debe ser aplicada en el tercio caudal del cuello. La vacuna IM en palomas mensajeras puede ocasionar una severa irritación del músculo pectoral. Los adyuvantes oleosos proveen títulos de anticuerpos superiores y tienen menores efectos secundarios que los carbomeros acuosos. Una vacuna oral efectiva no ha sido desarrollada todavía y requiere el aislamiento de una cepa apatógena de la variante de paloma (Gerlach, 1994).

VIII. La Enfermedad de Newcastle en el Perú

El Sector avícola ha venido desarrollándose sostenidamente durante los últimos tiempos en el Perú y tiene en la actualidad una considerable importancia para la economía del país. La producción mensual es de 33 millones de aves y alcanza el 57% del PBI (Producto Bruto Interno) pecuario, equivalente a 4,200 millones de soles anuales. El patrimonio avícola nacional representa el 23% del PBI agropecuario. La mayor población de aves se ubica en la costa, con el 79% del total nacional. Por otro lado es importante mencionar que el 80% de la producción comercializada es formal. Toda la producción es consumida a nivel local (Moreno, 2005). En la sierra y selva predominan los sistemas de producción a nivel de crianza familiar, destacándose la crianza conjunta de diversas aves como gallinas, patos y pavos (MINAG, 2005). El crecimiento promedio anual de los últimos años de la actividad avícola es de 8.5%. El consumo per cápita nacional es de 23.5 Kg. de carne y 96 huevos per cápita al año (SENASA, 2004), aportando cerca del 70% de proteína animal consumida por la población nacional (MINAG, 2005). La industria avícola genera 240,000 puestos de trabajo en la cadena productiva y tiene un importante potencial exportador, habiéndose exportado US\$ 3'015,000 en el 2002 (SENASA, 2004). A mediados del 2005 se logró la autorización de la exportación de carne de pollo al exigente mercado del Japón (Moreno, 2005).

En América Latina, quizás debido a la práctica de programas de vacunación que contemplan la aplicación de varias vacunas durante la vida del ave, los brotes de la enfermedad son poco frecuentes. Sin embargo, se han observado brotes serios de la enfermedad tanto en pollos de engorde como en ponedoras comerciales y reproductoras pesadas. Esto indica que el virus patógeno está presente en el ambiente avícola y es capaz de infectar a las aves y, aunque no cause mortalidades severas, sí encuentra una forma de sobrevivir dentro del ave y de

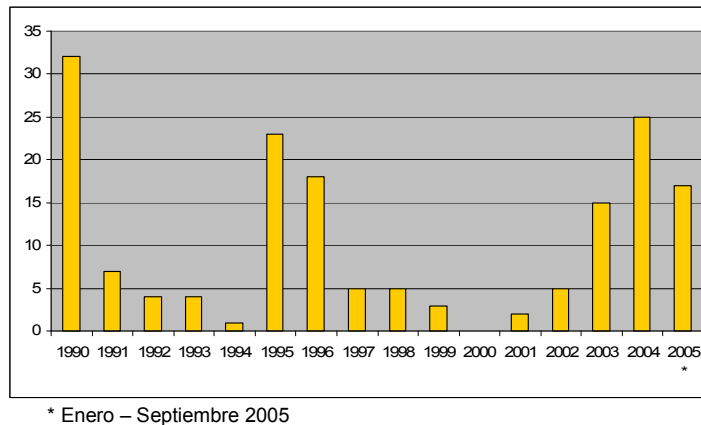
multiplicarse para en un futuro afectar aves que presenten bajos niveles de anticuerpos o que tengan fallas en el sistema inmune (Villegas et al, 1995). En Sudamérica, según informes de la Office Internacional des Epizooties (OIE), existen países en donde la enfermedad viene siendo controlada mediante programas estratégicos. En Chile no se han notificado casos de la forma velogénica desde 1975, mientras que en Argentina y Uruguay los últimos casos registrados datan de 1987 y 1984 respectivamente. Una situación parecida ocurre en algunos países centroamericanos, entre los cuales sobresale Costa Rica sin notificación de la enfermedad desde 1990, encontrándose en proceso de ser declarado Libre de la enfermedad (SENASA, 2004; SENASA Arg, 2000).

El primer informe de la enfermedad en América del Sur fue reportada en 1950, específicamente en Venezuela, al año siguiente, en 1951 fue diagnosticada en el Perú por primera vez (Philipps et al, 1951). Se ha estudiado la presencia de la enfermedad en los casos remitidos al Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), en donde la enfermedad ha sido catalogada como una de las principales enfermedades que afecta a la avicultura nacional, primero por Cortez (1970) refiriéndose a los años entre 1956 y 1969 en donde la ENC ocupó el tercer lugar en importancia, y luego por Inga (1991) concluyendo que un 2.52% de los casos fueron a causa del vENC, ocupando el décimo puesto en importancia durante los años 1978 y 1987.

Se realizó las caracterizaciones virales de 15 muestras de APMV-1 de diferentes aves (pollos de carne, aves de postura, aves de pelea y un loro) recolectadas en Lima entre 1989 y 1990. Los resultados (evaluaciones in vivo: ICPI, IVPI, MDT; e in vitro: formación de placas) mostraron que 14 de las muestras eran patógenas (velogénicas o mesogénicas) y 1 era apatógena. La subtipificación mediante MABs de estas cepas indicó que 4 de ellas pertenecían al sub tipo A, 9 al subtipo B y 2 al subtipo E2 (Yanayaco, 1995). Adicionalmente se logro la tipificación de dos cepas aisladas en el Perú entre 1993 y 1998 en el laboratorio de Weybridge, Inglaterra demostrándose la presencia de cepas que pertenecían al sub tipo A (Arequipa) y al sub tipo B (Lima) (Icochea, 2005).

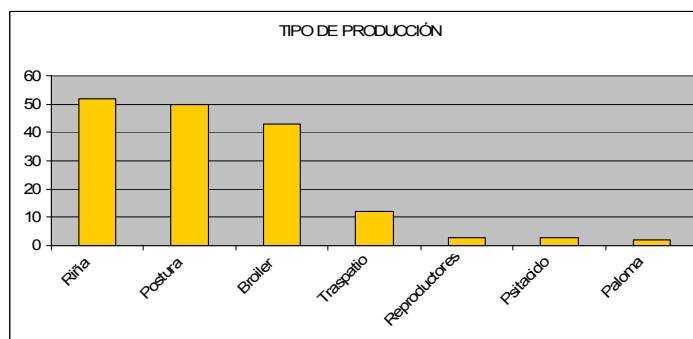
Adicionalmente se realizó un análisis retrospectivo de los casos de ENC diagnosticados por aislamiento viral en el Laboratorio de Patología Aviar de la FMV-UNMSM entre los años 1990 y 2005 (hasta el mes de septiembre). Siendo éste laboratorio uno de los mas importantes centros de diagnostico para la avicultura nacional y donde probablemente se recibe el mayor de numero de casos clínicos y pruebas serológicas tanto de Lima como a nivel nacional; y por tener un acercamiento no solo a nivel de granjas comerciales, sino también de crianza de traspatio, pequeños productores y aves ornamentales, consideramos importante el aporte que dicho análisis puede representar. Si bien no podemos concluir que los datos reflejan lo ocurrido a nivel nacional, consideramos que la estadística que proporciona es una visión representativa de lo que ha acontecido durante los últimos años en nuestro país.

Cuadro N° 11: Casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio De Patología Aviar – FMV-UNMSM (1990-2005)



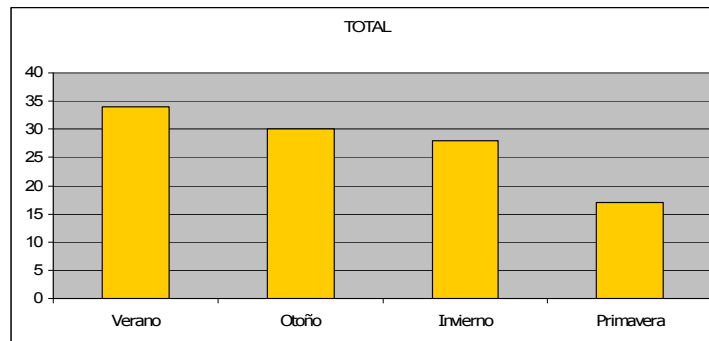
En el análisis se nota claramente un cambio en la incidencia de la presentación de la enfermedad, a partir de 1995 la incidencia de la enfermedad fue decreciendo, hasta llegar a ningún caso para el 2000, luego, a partir del 2001 la presentación de la enfermedad empezó a incrementarse de forma considerable. Cabe mencionar que los diagnósticos de los últimos tres años corresponden en su mayoría a diagnósticos realizados en aves de riña.

Cuadro N° 12: Casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio De Patología Aviar – FMV-UNMSM por tipo de producción (1990- Septiembre 2005)



El 95% de los casos se encontraron dentro de los 4 principales tipos de producción, las aves de riña en primer puesto (32%), seguidas por gallinas de postura (30%), luego por pollos de carne (26%) y ya con un considerable menor número por aves de traspatio (7%).

Cuadro N° 13: Casos de ENC diagnosticados en el Laboratorio De Patología Aviar – FMV-UNMSM por estación (1990-2002)



Hubo prácticamente la misma incidencia de casos en todas las estaciones, con una ligera disminución en los meses de primavera (Set – Dic).

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), organismo público descentralizado del Ministerio de Agricultura, es la Autoridad Nacional competente en el control y erradicación de la ENC (Ley N°27322) y responsable de velar por el cumplimiento del Reglamento de Control y Erradicación de la Enfermedad de Newcastle (Decreto Supremos (D.S.) N°010-2003-AG) y demás disposiciones complementarias, el ámbito de acción obligatorio es en todo el territorio nacional. Los puntos más importantes de dicho reglamento se detallan a continuación (SENASA, 2003):

- ✓ Se toma en cuenta la definición de la ENC establecida por la OIE.
- ✓ Todas las vacunas deben estar registradas y la semilla maestra deberá tener menos de 0.4 de ICPI.
- ✓ Pollos de engorde, ponedoras, reproductores, aves de pelea, crianza de traspatio y pavos deberán ser vacunados obligatoriamente tomando como referencia el siguiente esquema:

POLLOS DE ENGORDE

1ra semana	Vac. viva + Vac. Inactivada
Según calendario de cada empresa	Vac. Viva

En áreas libres podrá omitirse la vacuna inactivada

PONEDORAS y REPRODUCTORAS

1ra semana	Vac. Viva + Vac. Inactivada
Levante	2 Vac. Vivas
Antes de inicio de producción	Vac. Inactivada
Si se realiza muda	Vac. Viva + Vac. Inactivada

En áreas libres podrá omitirse la vacuna inactivada de la primera semana

AVES DE PELEA

1ra semana	Vac. Viva
Levante (2 – 20 semanas)	Vac viva + Vac. Inactivada
Producción (21 – 74 semanas)	Vac viva + Vac. Inactivada (una por año)
Muda (mayor a 60 semanas)	Vac. Viva

CRIANZA DE TRASPATIO

Pollos de engorde	Según especificaciones correspondientes
Gallinas	

PAVOS DE ENGORDE

1ra semana	Vac. viva
Período de engorde	1 o 2 Vac. Vivas

REPRODUCTORAS DE PAVOS

1ra semana	Vac. viva
Levante	2 Vac. Vivas
Durante la producción	1 o 2 Vac. Vivas

- ✓ En patos, gansos, codornices y avestruces el programa de vacunación se aplicará en función al riesgo que epidemiológicamente se determine.
- ✓ Se realizarán monitoreos serológicos en todas las granjas mediante HI u otra prueba que el SENASA disponga por lo menos una vez al año y de la siguiente manera:
 - Aves de engorde: mínimo 30 aves por unidad productiva 5 días antes de la venta
 - Aves reproductoras y de postura: mínimo 30 aves por unidad productiva cada 2 meses
 - Aves de pelea: mínimo 10 aves por unidad de crianza en época de muda (1 enero – 30 marzo).
- ✓ Comunicar al SENASA en caso de observar signos clínicos compatibles con la ENC.
- ✓ Se consideran granjas negativas a aquellas con títulos bajos y sin signos clínicos.
- ✓ Se consideran granjas positivas a aquellas con aislamientos con ICPI superiores a 0.7 y/o con presencia de títulos altos y signos clínicos.
- ✓ Se consideran granjas sospechosas a aquellas con signos clínicos independientemente del título; en el caso de engorde con títulos altos en HI con PGT 1:64 sin signos clínicos; en el caso de reproductores con títulos altos con HI promedio geométrico 1:256 sin signos clínicos.

En noviembre del 2002 se firmó el Convenio Asociación Peruana de Avicultores (APA)-Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) con el principal objetivo de declarar al Perú como país libre de las enfermedades aviares de mayor impacto económico y que generan obstáculos al comercio, dentro de las cuales se encuentra la ENC. Los resultados obtenidos del trabajo compartido entre el sector privado y público, la importancia de la avicultura para la

economía del país y el convenio antes citado constituyen la base para la creación del Programa Nacional de Sanidad Avícola (SENASA, 2004).

Se han realizado estimados sobre la base de índices técnicos de las pérdidas potenciales que podrían causar brotes de la ENC en nuestro medio obteniéndose que (SENASA, 2004):

- ✓ La pérdida directa total por el brote en un lote de 40,000 pollos sería de US\$ 42,813 en donde la pérdida directa promedio por pollo sería de aproximadamente US\$ 1.07.
- ✓ Si se afectara el 10% de la población en un lote de 2'600,000 pollos, la pérdida sería de US\$ 2'782,808, y en el caso extremo en que se afectara el 100% las pérdidas serían superiores a los US\$ 27 millones.
- ✓ En un lote de 15,000 gallinas ponedoras comerciales la pérdida sería de US\$ 77,392 y en el caso que se viera afectada el 10% de la población total (900,000 ponedoras) la pérdida mensual ascendería a los US\$ 500,000.

En la actualidad la enfermedad esta presente en el Perú como lo indican los reportes del SENASA sobre brotes de la enfermedad, como los ocurridos en Lima, en el distrito de Villa María del Triunfo, en febrero del 2003 (Resolución Directoral N°63-2003-AG-SENASA LIMA-CALLAO) y en Moquegua en septiembre del 2002 (Resolución Directoral N°051-2002-AG-SENASA-MOQUEGUA) (Ferrer, 2005).

Según el III Censo Nacional Agropecuario (INEI, 1994), el 41.5% de las unidades agropecuarias del departamento de Lima crían aves domesticas, siendo las aves de crianza no tecnificada una fuente de mantenimiento y difusión del virus que representa un riesgo para la crianza industrial, porque aun cuando la vacunación es total en este tipo de aves, hay muchos factores que pueden conducir a una falla en los programas de vacunación y conducir a la presentación de brotes de la enfermedad (Ferrer, 2005).

La ENC está presente en nuestro país, por lo que es necesario conocer cuales son los principales reservorios de esta enfermedad, se sospecha al igual que en otros países de las aves silvestres (Ravina, 2005), por lo que se han realizado estudios buscando niveles de anticuerpos que indiquen reto con el virus de la ENC en el departamento de Lima en aves silvestres de las órdenes Columbiformes, Paseriformes y Psitaciformes obteniéndose en todos los casos resultados negativos significando esto que no constituyen el principal reservorio del virus en la zona (Carrión, 2000; Shimabukuro, 2000; Chang, 1998). La búsqueda de reservorios debe continuar, e incluir a las aves de riña y de crianza casera, siendo ambos responsabilizados de mantener la enfermedad endémica en países donde su crianza es masiva y de ocasionar brotes en las explotaciones avícolas industriales (Ferrer, 2005).

Si bien no se han presentado hasta el momento brotes en codornices en nuestro medio, no se aplica ningún programa de vacunación en la crianza de estas aves representando esto un riesgo (Quevedo, 2003).

En los últimos años se han realizado estudios en donde se analizaron las muestras de sueros recolectadas en el Programa de Monitoreo Serológico realizado por el SENASA entre los años 2001 y 2002 obteniéndose los siguientes resultados (Ravina, 2005: Ferrer, 2005):

- ✓ En los departamentos del sur del país (Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Cuzco, Apurímac y Puno) la ENC es endémica en las aves de crianza tecnificada, siendo las aves de postura el principal factor de riesgo. Las prevalencias halladas son de 4.7% del total de las muestras positivas, donde el 11.7% fue de aves de postura, el 6.1% fue de pollos de carne dentro de la crianza tecnificada; 3.9% de aves de crianza casera y 0.2% para las aves de riña. Lo que evidencia que existe reto viral en campo.
- ✓ En Lima la prevalencia fue de 1.8% para la crianza industrial y de 9.9% en aves de crianza no tecnificada, estableciéndose que la crianza no tecnificada es un factor de riesgo. El grupo de aves de crianza casera tuvo un 15.38% y las aves de riña tuvieron un 3.73%, sin embargo, las aves de riña representan un mayor riesgo para la diseminación de la enfermedad por diversas condiciones de manejo y/o costumbres. Dentro de la crianza industrial, los pollos de carne fueron el principal grupo que presentó títulos compatibles a reto viral. Estos resultados indican que la enfermedad se encuentra endémica en el departamento de Lima. Vale la pena recalcar que la totalidad de los casos compatibles con reto de campo en las aves de crianza no tecnificada se dieron en aves no vacunadas. (Ferrer, 2005).

IX. Bibliografía

1. ALBA, M; ICOCHEA, E; GONZALEZ, R; ALVA, B. 2002. Protection study of NDV in broilers with two commercial vaccines containing VG-GA and PHY.LMV.42 strains. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 2002. Nashville, Tennessee. pg. 8.
2. ALEXANDER, D. 1989. Newcastle Disease. En: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd ed. Chairman, H; Arp, L; Domermuth, C; Pearson, J (eds.) Am. Assoc. Avian Pathol. Kendall Hunt Publishing Company. USA. pg. 114-120.
3. ALEXANDER, D; MANVELL, R; LOWINGS, J; FROST, K; COLLINS, M; RUSSELL, P. 1997. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. Avian Pathology. June, v 26(2) p.399-418.
4. ALEXANDER, D. 2003. Newcastle Disease and Other Avian Paramixoviridae Infections. En: Diseases of Poultry, Cap 2. 11^o Edition. Saif, Barnes, Glisson, Fadly, Mc Dougald, Swayne (eds.). AAAP Iowa State University – USA. P. 63-87.
5. ALEXANDER, D. 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxoviruses. En: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 4th ed. Swayne D. et al (eds.) p. 156–163. Am. Assoc. Avian Pathol. Kennett Square – Estados Unidos.
6. ALEXANDER, D; BELL, J; ALDERS R. 2004. Technology review: Newcastle disease with special emphasis on its effect on village chickens. FAO Animal Production and Health. Rome.

7. AL-GARIB, S; GIELKENS, A; GRUYS, E; KOCH, G. 2005. Characterization of the cellular immune response in the respiratory tract and harderian gland of chickens experimentally infected with Newcastle disease virus. En: 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istanbul – Turkey. pg: 289.
8. ANGADJI, L; GHORASHI, S; ASMAR, M; MOGHADDAM, M; SHAMSARA, M; TABAR, R. 2005. Detection of Newcastle disease virus (NDV) by RT-PCR. En: 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istanbul – Turkey. pg: 222.
9. ANTILLON, A. 2005. Enfermedad de Newcastle. En: XVII curso Avimex de Salud y Productividad. Enfermedades Virales de Alto Impacto en la Avicultura. 29 Julio. México D. F. pgs: 27-43.
10. BAEZ, J. 1994. Enfermedad de Newcastle. En: Patología de las aves. P 15-18. Ed Trillas México.
11. BEARD, C; HANSON, R. 1984. Newcastle disease. En: Diseases of Poultry. 8va edición. Ed. Hofstand, M. et al. p. 452-470. Iowa University Press. Estados Unidos
12. BERINSTEIN, A; SELLERS, H; KING, D; SEAL, B. 2001. Use of Heteroduplex mobility assay to detect differences in the fusion protein cleavage site coding sequence among Newcastle disease virus isolates. Journal of Clinical Microbiology, September 2001. p 3171-3178. vol. 39. N°9.
13. BERINSTEIN, A; VAZQUEZ-ROVERE, C; ASURMENDI, S; GOMEZ, E; ZANETTI, F; ZABAL, O; TOZZINI, A; GRAND, D; TABOGA, O; CALAMANTE, G; BARRIOS, H; HOPP, E; CARILLO, E. 2005. Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. Vaccine. 2005 Aug 11 (Epub ahead of print).
14. BROWN, I; ALEXANDER, D. 2003. Newcastle disease. En: II Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle "Estandarización de Criterios Sanitarios para el Comercio" ALA – OIE. 13 – 15 de agosto. Lima – Perú.
15. BRUGH, M. 1982. Aislamiento e identificación del virus de la Enfermedad de Newcastle. En: Técnicas en virología, histopatología y micoplasmas aviares. Curso corto en español. Pedro Villegas (ed). Departamento de Medicina Aviar. Universidad de Atlanta, Georgia – USA. 24 agosto – 2 setiembre.
16. CABALLERO, F. 2003. Evaluación Experimental de la Patogenicidad de un Virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle y su respuesta inmune humoral en aves Columbiformes. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
17. CARRIÓN, 2000. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en aves silvestres del orden columbiforme en Baños de Boza, distrito de Okayama, provincia de Huaral. Tesis bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.

18. CARTER, G. R; WISE, D. J; FLORES, E. F. 2005. Paramyxoviridae. En: A Concise Review of Veterinary Virology. Internacional Veterinary Information Services, Ithaca, Nueva York (www.ivis.org Documento N° A2418.0905).
<http://www.ivis.org/advances/Carter/Part2Chap18/chapter.asp?LA=1>
19. CATTELI, E; BONCI, M; CECCHINATO, M; DELOGU, M; RICCHIZZI, E; DE MARCO, M; MACRI, R; OBBER, F; DE MATTEO, P; FRANCIOSI, C. 2005. Shedding of velogenic Newcastle disease virus following experimental infection of vaccinated pheasants. En: 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. pg. 219
20. enfermedad de Newcastle en aves silvestres paseriformes y columbiformes en al provincia de Chancay. Tesis para optar el título de Medico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.
21. CEC – Commission of the European Communities, 1992. Council directive 92/66/EEC del 14 de Julio de 1992. Introducing community measures for the control of Newcastle disease. Official Journal of the European Communities, L260, I-20.
22. © Microbiology@Leicester 2005. Paramyxoviruses. Updated 22.09.2005
<http://www.micro.msb.le.ac.uk/3035/paramyxoviruses.html>
23. COMOTTO, G. E. 2000. Enfermedad de Newcastle en: Enfermedades de las aves. p. 106-113. Imprenta Zagazeta S.R.Ltda. Lima – Perú.
24. CONNARIS, H; TAKIMOTO, T; RUSSELL, R; CRENNELL, S; MOUSTAFA, I; PORTNER, A; TAYLOR, G. 2002. Probing the sialic acid binding site of the hemagglutinin-neuraminidase of Newcastle disease virus: identification of key aminoacids involved in cell binding, catalysis and fusion. Journal of Virology, February 2002. p. 1816-1824, vol. 76, N°4.
25. CORTEZ, S. 1970. Estudio retrospectivo de las principales enfermedades diagnosticadas en el laboratorio de patología aviar durante 1956-1969. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.
26. CREELAN, J; GRAHAM, D; McCULLOUGH, S. 2002. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Avian Pathology, vol 31, N°5. October, pg. 493-499(7).
27. CZEGLIEDI, A; KOVACS, G; LOMNICZI, B. 2005. Phylodinamics of Newcastle disease virus genotypes. En: 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. pg: 365.
28. DE LEEUW, O; HARTOG, L; KOCH, G; PEETERS, B. 2003. Effect of fusion protein cleavage site mutations on virulence of Newcastle disease virus: non-virulent cleavage site mutants revert to virulence after one passage in chicken brain. J Gen Virol 84, 475-484.
29. DE LEEUW, O; KOCH, G; HARTOG, L; RAVENSHORST, N; PEETERS, B. 2005. Virulence of Newcastle disease virus is determined by the cleavage site of the fusion protein and

- by both the stem region and globular head of the haemagglutinin-neuraminidase protein. J Gen Virol, 2005 Jun; 86 (Pt 6):1759-1769.
30. DOCHERTY, D; FRIEND, M. 2001. Newcastle disease. En: Field Manual of Wildlife Diseases: General Field Procedures and Diseases of Birds. Friend, M; Franson, C (eds.) Chapter 21. pgs 175-179. USGS – US Geological Survey – US Department of the Interior. Washington D.C.
http://www.nwh.usgs.gov/pub_metada/field_manual/chapter_21.pdf (Consulta 10/05)
 31. DOMANSKA-BLICHAZ, K; SMIETANKA, K; MINTA, Z. 2005. Comparison of RT-PCR and virus isolation for detection of Newcastle disease virus in experimentally infected chicken. En: 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. pg: 366.
 32. ELTAYEB, A; HANSON, R. 2005. The interaction between E. coli and Newcastle disease virus in chickens. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 16-20. Minneapolis – Minnesota. pg. 42.
 33. ESTUDILLO, J. 2000. Algunas consideraciones sobre la enfermedad de Newcastle. En: "Enfermedades Emergentes: Enfermedad de Newcastle". Cap 6. Productores avípecuarios. México D.F.
 34. FAO. 2003. Avicultura familiar
<http://www.fao.org/ag/esp/revista/0203sp1.htm> (consulta 09/05)
 35. FERNÁNDEZ, R. 2005. La enfermedad de Newcastle: Situación actual, medidas de control y prevención. En: XIX Congreso Latinoamericano de Avicultura. 4-7 de octubre. Panamá.
 36. FERRER, R. 2005. Prevalencia de anticuerpos al virus de la enfermedad de Newcastle en aves domésticas *Gallus gallus* del departamento de Lima en el año 2001. Estudio caso control. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
 37. FENNER, F. 1992. Virología veterinaria. Ed. Acribia S.A. Zaragoza - España
 38. GERLACH, H. 1994. Disease etiologies: Viruses. En: Avian Medicine: Principles and applications. Section five. B.W. Ritchie; G. J. Harrison; L. R. Harrison (eds.). Florida, Wingers Publishing Inc. p. 920-929.
 39. HIETALA, S; HULLINGER, P; CROSSLEY, B; KINDE, H; ARDANS, A. Enviromental air sampling to detect exotic Newcastle disease virus in two California comercial poultry flocks. J Vet Diagn Invest. 2005 Mar;17(2):198-200.
 40. HOERR, F. 2004. Newcastle disease. En: Curso de Fisiopatología Aviar – UNMSM – FMV. 18-20 noviembre. Lima – Perú.
 41. HUANG, Z; KRISHNAMURTHY, S; PANDA, A; SAMAL, S. 2003. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. Journal of Virology, August 2003. p 8673-8685. vol 77, N°16.

42. HUANG, Z; PANDA, A; ELANKUMARAN, S; GOVINDARAJAN, D; RODKERMANN, D; SAMAL, S. 2004. The hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *Journal of Virology*, april 2004, p. 4176-4184, vol. 78, N°8.
43. HUNG, A; MEDRANO, G; VALLENAS, G. 2004. Diagnóstico Molecular de Newcastle mediante RT-PCR y RFLP. *Mundo avícola y porcino* N°50 Mar-Abr, Pgs 7-9.
44. ICOCHEA, ELIANA. 2005. Comunicación personal.
45. ICTV: INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 2005. Reports of the International Committee on Taxonomy of viruses. <http://www.ictvdb.iacr.ac.uk>
46. INEI. 1994. III censo nacional agropecuario (CENAGRO). Lima – Perú.
<http://www.inei.gob.pe/web/resultadocenso.asp>
47. INGA, E. 1991. Análisis estadístico retrospectivo de las principales enfermedades diagnosticadas en el laboratorio de patología aviar en los últimos diez años. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.
48. JORDAN, F. T. W. 1990. Paramyxoviridae (Newcastle disease and Others). En: *Poultry Diseases*. 121-136. 3rd Edition. Bailliere Tindal: Londres
49. JORGENSEN, P; HANDBERG, K. 2005. Laboratory diagnosis of Newcastle disease by RT-PCR and by inoculation in SPF chicken embryos. En: 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. pg: 363.
50. KAPCZYNSKY, D; KING, D. 2005. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercial available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*. 2005 May 16;23(26):3424-3433.
51. KIANIZADEH, M; SAMADI, S; NAJAFI, M; POURBAKHASH, A; TOROGHI, R. 2005. Genotyping, pathogenicity and molecular characterization of Iranian Newcastle disease virus. En: 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. pg: 364.
52. KINDE, H; HULLINGER, P; CHARLTON, B; McFARLAND, M; HIETALA, S; VELEZ, V; CASE, J; GARBER, L; WAINWRIGHT, S; MIKOLON, A; BREITMEYER, R; ARDANS, A. 2005. The isolation of exotic Newcastle disease (END) virus from nonpoultry avian species associated with the epidemic of END in chickens in southern California:2002-2003. *Avian Dis*. 2005 Jun; 49(2):195-198.
53. KING, D. 1999. Enfermedad de Newcastle en: XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura por la Alimentación del Futuro. APA-ALA del 21 – 24 de septiembre. Lima-Perú. Pgs 56-61.

54. KING, D. 2002. Enfermedad de Newcastle: situación mundial y control. En: memorias del X seminario internacional de patología y producción aviar, del 27 al 31 de mayo. Georgia - Estados Unidos.
55. KING, D; WAKAMATSU, N; PEETERS, B; SAMAL, S; BROWN, C; SEAL, B. 2003. The effect of mutations in Newcastle disease virus strains La Sota and Beaudette C on their pathogenicity in chickens. En: 140th AVMA Annual Convention. July 19-23. Denver, CO.
56. KING, D; KAPCZYNSKI, D; AFONSO, C; PIACENTI, A. 2005. Contrasting results from molecular and biological pathogenicity assays of Newcastle disease virus isolate Iowa 1519. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 12-20. Minneapolis – Minnesota. pg. 33.
57. KING, D; KOMMERS, G; SEAL, B; BROWN, C. 2002. Biological and molecular characterization of recent Newcastle disease virus isolates before and after passage in chickens. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 2002. Nashville, Tennessee. pg. 8.
58. KITCHING, R. 2004. Management of exotic diseases outbreaks: Learning by example. 23 Congreso Mundial de Buiatría. 11-16 Julio 2004. Quebec – Canada.
59. LAUERMAN, L. H. 1998. Newcastle disease virus RT-PCR assay. En: Nucleic Acid Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases. USA. pg. 124.
60. LEE, Y; SUNG, H; CHOI, J; LEE, E; KIM, J; SONG, C. 2005. Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant Baculovirus subunit vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase protein. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 12-20. Minneapolis – Minnesota. pg. 76.
61. LIU, X; CAO, Y. 2005. Newcastle disease virus evolution: multiple genetic lineages and virulence variation with adaptation in different host species. En: 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istanbul – Turkey. pgs: 150-151
62. LU, H; XIE, Z; LIN, L. 2005. Detection of avian respiratory RNA viruses by multiplex RT-PCR. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 12-20. Minneapolis – Minnesota. pg. 50.
63. MAHO, A; BOULBAYE, N; ETOBIA, J. 2000. La enfermedad de Newcastle y las parasitosis en la cria familiar de aves en el sur de Chad. Laboratorio de Investigación Veterinaria y Zootécnica de Farcha. INFPD Newsletter vol. 10 N° 1 y 2. Ene – Jul 2000.
<http://www.fao.org/ag/aga/agap/lpa/fampo1/infpd101es.htm> (Consulta 09/05)
64. MASE, M; IMAI, K; SANADA, Y; SANADA, N; YUASA, N; IMADA, T; TSUKAMOTO, K; YAMAGUCHI, S. 2002. Phylogenetic análisis of Newcastle disease virus genotypes isolated in Japan. Journal of Clinical Microbiology. October 2002. p. 3826-3830, vol 40, N°10.
65. MARTINS, P. 2003. Impacto económico de las enfermedades avícolas de la lista "A" de la OIE. En: II Seminario Internacional Influenza Aviar y Enfermedad de Newcastle "Estandarización de Criterios Sanitarios para el Comercio" del 13 – 15 de agosto. Lima – Perú.
66. Mc NULTY, S. 1994. Paramyxovirus. © 1994 Veterinary Sciences Division.
<http://www.parent.qub.ac.uk/afa/vs/vsd22.jpg>

67. MEBATSION, T; VERSTEGEN, S; DE VAAN, L; ROMER-OBERDORFER, A; SCHRIER, C. A. 2001. A recombinant Newcastle disease virus with low-level V protein expression is immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos. *Journal of Virology*, January 2001. p.420-428. Vol. 75. N°1
68. MERCK VETERINARY MANUAL. 2005. Newcastle disease
<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/203800.htm> (Consulta 10/05)
69. MILLER, P; KING, D; SUAREZ, D. Quantification of Newcastle disease virus by real time RT-PCR. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 16-20. Minneapolis – Minnesota. pg. 75.
70. MINAG – MINISTERIO DE AGRICULTURA –PERÚ. 2005. Situación actual – Aves.
Http://www.portalagrario.gob.pe/pec_real.shtml (Consulta 10/05)
71. MO, I; ROH, H. 2004. Evaluation of the efficacy of Newcastle disease vaccine (Newplex™) in the commercial broiler. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 2004. Philadelphia, Pennsylvania. pg. 83.
72. MONROY, J. 2000. Epidemiología de la enfermedad de Newcastle velogénica viscerotrópica. En: "Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle". Dpto. Medicina Preventiva, FMVZ, UNAM.
73. MORENO, M. 2005. Editorial. *Mundo Veterinario* año 3, N° 11, Octubre 2005, pg. 1.
74. MOUSA, S. 2002. Field evaluation of a novel bivalent vaccine against infectious bursal disease (IBD) and Newcastle disease (ND) by mixing viruses and antibodies contained in hyperimmune egg yolk. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 2002. Nashville, Tennessee. pg. 42.
75. MUÑOZ, R. 2004. Serología en reproductoras y pollo de engorde. En: XXV Seminario Avícola Internacional AMEVEA – Colombia.
76. MUÑOZ, P; TOSCANO, A; CHAPA, J; LUCIO, E. 2002. Evaluación de protección contra la enfermedad de Newcastle ante un desafío utilizando diferentes calendarios de vacunación. En: Memorias dela XXVII Convención Anual – Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). 1-4 de mayo. Puerto Vallarta.
77. NAGARAJ, R; HADDAD, E; GROSSE, D; LINK, D; STOWERS, R; WHITFILL, C. 2004. Virus replication and onset of protection following in ovo vaccination with a novel Newcastle disease vaccine. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 2004. Philadelphia, Pennsylvania. pg. 82.
78. NAKAYA, T; CROS, J; PARK, M; NAKAYA, Y; ZHENG, H; SAGRERA, A; VILLAR, E; GARCÍA-SASTRE, A; PALESE, P. 2001. Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Journal of Virology*, Decembre 2001, p. 11868-11873, Vol. 75, N°23.
79. NUÑEZ CORREA,P; REYES, R. 2002. Valoración de la viabilidad de las vacunas vivas utilizando el método de aspersión. En: Memorias dela XXVII Convención Anual –

Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). 1-4 de mayo. Puerto Vallarta.

80. NWANTA, J; UMOH, J; ABDU, P; AJOGI, I. 2005. Experimental trials with Newcastle disease virus (NDV) vaccine strains, V4HR and La Sota administered in chickens via eye drop, drinking water and commercial feed in Kaduna state, Nigeria. En: 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istanbul – Turkey. pg: 288.
81. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. OIE, 2002. Enfermedad de Newcastle. (Última revisión 22/04/2002)
http://www.oie.int/esp/maladies/fiches/e_A160.htm. (consulta: 10/05)
82. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. OIE, 2004. Newcastle Disease. Cap. 2.1.15. En: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial animals (Updated 23.07.2004)
<http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A.00038.htm> (consulta: 10/05)
83. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. OIE, 2004b. Single list of diseases notifiable to the OIE – Avian Diseases (Updated 22.12.2004)
http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification.htm (consulta: 10/05)
84. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. OIE, 2005a. Inform on the world animal health situation in all transparency
http://www.oie.int/eng/info/en_info.htm (consulta: 10/05)
85. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. OIE, 2005b. Disease information
http://www.oie.int/eng/info/hebdo/a_dsum.htm (consulta: 10/05)
86. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES. OIE, 2005c.
http://www.oie.int/eng/info/en_presdistribgeo.htm (consulta: 10/05)
87. OKOYE, J; AGU, A; CHINEME, C; ECHEONWU, G. 2000. Pathological characterization in chickens of a velogenic Newcastle disease virus isolated from guinea fowl. En: XXI World Poultry Congress. August 20-24. Montreal – Canada.
88. OLDONI, I; BROWN, C; KING, D; SAMAL, S; SEAL, B. 2005. The use of in situ hybridization and immunohistochemistry to study the pathogenesis of various Newcastle disease virus strains and recombinants in embryonated chicken eggs. Microb Pathog. 2005. Sep;39(3):69-75
89. OMAR, A; BEJO, M; IDERIS, A; YUSOFF, K. 2005. Development of Sybr Green i based real-time PCR assays for the detection of virus infections in chickens. En: 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istanbul – Turkey. pg: 224
90. ONAPA, M; MUKA, G; KABAGAMBE, E; CHRISTENSEN, H; BISGAARD, M. 2005. A prospective study of risk factors for Newcastle disease in rural free-range chickens. En: 14th World Veterinary Poultry Congress. 22-26 August. Istanbul – Turkey. pg: 220
91. OTIM, M; MUKIIBI, G; CHRISTENSEN, H; BISGAARD, M. 2005. Immune response to Newcastle disease vaccination of free-range village chickens experimentally

- immunosuppressed by aflatoxin or infectious bursal disease virus. En: 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. pg: 284.
92. PANIGRAHY, B; SENNE, D; PEDERSEN, J. 2002. Measures of pathogenicity for the pigeon paramixovirus tipe 1 (PPMV-1). En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 2002. Nashville, Tennessee. pg. 8.
 93. PARK, M; GARCÍA-SASTRE, A; CROS, J; BASLER, C; PALESE, P. 2003. Newcastle disease virus V protein is a determinant of host range restriction. Journal of Virology, September 2003, p. 9522-9532, vol 77, n°17.
 94. PEDERSEN, J; SENNE, D; WOOLCOCK, P; KINDE, H; KING, D; WISE, M; PANIGRAHY, B; SEAL, B. 2004. Phylogenetic relationship among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. Journal of Clinical Microbiology, May 2004, p. 2329-2334, vol. 42, N°5.
 95. PEROZO, F; VILLEGAS, P. 2005. Caracterización molecular del virus de la enfermedad de Newcastle inactivado en tarjetas FTA. En: XIX Congreso Latinoamericano de Avicultura. 4-7 octubre. Panamá.
 96. PEETERS, B; DE LEEUW, O; KOCH, G; GIELKENS, A. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from clonated cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. Journal of Virology, June 1999. p. 5001-5009. vol. 73. N°6.
 97. PHAM, H; NAKAJIMA, C; OHASHI, K; ONUMA, M. 2005. Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Newcastle disease virus. J Clin Microbiol. 2005 Apr;43(4):1646-1650.
 98. PHILIPPS, L; NAVAES, O; FERNADES, L. 1951. La neumoencefalitis aviar en el Perú. Rev Inst Nac Biol Animal. 2:31-51.
 99. QUEVEDO, T. 2005. Estudio clínico, serológico y anatóhistopatológico experimental de una cepa velogénica del virus de la enfermedad de Newcastle en codornices (*Coturnix coturnix japonica*) Tesis bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima (Sin Publicar)
 100. RAVINA, P. 2005. Monitoreo serológico de la enfermedad de Newcastle efectuado en aves domésticas (*Gallus gallus*) en Ica, Arequipa, Moquegua, Tacna, Junín, Huancavelica, Ayacucho, Cuzco, Apurímac y Puno – 2001. Tesis bachillerato. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.
 101. RIDEOUT, B. 2004. The role of a zoo pathologist in disease surveillance: Exotic diseases, exotic animals and exotic places. Center for Reproduction of Endangered Species, Zoological Society of San Diego – San Diego. (Updated 13.11.2004)
www.avis.org/proceedings/ACVP/2004/Rideout/chapter_frm.asp?LA=1
 102. ROY, P; VENUGOPALAN, A. 2005. Unexpected Newcastle disease virus in day old commercial chicks and breeders hen. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2005 Jul; 28(4):277-285.

103. RUBIO GARCÍA, M; LEDESMA, N; SÁNCHEZ RAMIREZ, E; POSADAS, E. Comparación del uso de un inmunoestimulante y de un compuesto antiestrés en la respuesta inmunológica contra la enfermedad de Newcastle en pollo de engorda y su efecto sobre la productividad de la parvada. En: Memorias de la XXVII Convención Anual – Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA). 1-4 de mayo. Puerto Vallarta.
104. SEAL, B; KING, D; SELLERS, H. 2000. The avian response to Newcastle disease virus. *Dev Comp Immunol*. 2000 Mar-Apr; 24(2-3):257-268.
105. SEAL, B; WISE, M; PEDERSEN, J; SENNE, D; ALVAREZ, R; SCOTT, M; KING, D; YU, Q; KAPCZYNSKI, D. 2005. Genomic sequences of low virulence avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus) isolates obtained from live-markets in North America not related to commonly utilized commercial vaccine strains. *Veterinary Microbiology*. 106(1-2):7-16.
106. SELLERS, H; LINNEMAN, E; KAPCZYNSKI, D. 2005. Use of a multiplex RT-PCR to differentiate lentogenic NDV from END. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 16-20. Minneapolis. Minnesota. pg. 32.
107. SELLERS, H. S; SEAL, B. S. 2000. Complete sequence for the B1 strain of Newcastle disease virus. U.S. Department of Agriculture/Agriculture Research Services, Southeast Poultry Research laboratory, Athens, Georgia – USA
<http://www.ictvdb.rothamsted.ac.uk/Ictv/index.htm> (consulta 10/05)
108. SENASA Arg, 2000. Argentina, el último foco de ENC fue registrado en octubre de 1987
<http://senasa.gov.ar/sanidad/aves/avesnew.php> (consulta 09/05)
109. SENASA, 2001. Determinación de anticuerpos de Newcastle en la crianza avícola en el Perú. *Mundo avícola y porcino* N°38 Jul-Ago.2001, Pgs 20,21.
110. SENASA, 2003. Reglamento de control y erradicación de la enfermedad de Newcastle. D.S. N°010-2003-AG
http://www.senasa.gob.pe/normatividad/sanidad_animal/1170.pdf (consulta 10/05)
111. SENASA, 2004. Plan Estratégico para la creación del Programa Nacional de Sanidad Avícola. Ministerio de Agricultura. Lima. Abril 2004.
http://www.senasa.gob.pe/sanidad_animal/pn_sanidad_avicola/red_nac_cri_pat/pla_est_pronasa.pdf (consulta 10/05)
112. SENTHURAN, S; VIJAYARANI, K; KUMANAN, K; NAINAR, A. 2005. Pathotyping of Newcastle disease virus isolates from pet birds. *Acta Virol*. 2005;49(3):177-182.
113. SERGEL, T; MCGINNES, L; MORRISON, T. 2000. A single amino acid change in the Newcastle disease virus fusion protein alters the requirement for HN protein in fusion. *Journal of Virology*, June 2000. p. 5101-5107, vol. 74, N°11.
114. SHIMABUKURO, C. 2000. Determinación de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle en psitácidas en cautiverio en el parque de las leyendas.

- Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Med. Vet. Univ. Nac. Mayor San Marcos, Lima.
115. SILVA, A. 1997. Inmunoprotección por vacuna oleosa y/o viva frente a una infección experimental de la enfermedad de Newcastle en pollos de carne. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
 116. STANNARD, L. 1995. Paramyxoviruses. © Linda M. Stannard 1995
<http://web.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/paramyx.html>
 117. SWAYNE, D. 2003a. Viral respiratory diseases of poultry (AI an NDV focus). En: 140th AVMA Annual Convention. July 19-23. Denver, CO.
 118. SWAYNE, D. 2003b. Actualidades sobre la enfermedad de Newcastle en los Estados Unidos: Situación del brote, vacunas y pruebas de diagnóstico. En: III Seminario Latinoamericano de Merial "Enfermedades Respiratorias" XVIII Congreso Latinoamericano de Avicultura. 9 de Octubre – Santa Cruz – Bolivia.
 119. SMIETANKA, K; MINTA, Z; DOMANSKA-BLICHAZ. 2005. Molecular characterization of Newcastle disease virus strains isolated in Poland. En: 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. pg: 223
 120. TRIPATHY, D. 2002. Future of new generation of virus-vectored vaccines for efficient poultry production. En: Memorias de la XXVII Convención Anual Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA) 1-4 de Mayo. Puerto Vallarta.
 121. UJVARI, D; WEHMANN, E; HERCZEG, J; LOMNICZI, B. 2005. Identification and subgrouping of pigeon type Newcastle disease virus strains by restriction enzyme cleavage site analysis. Virol Methods. 2005 Sep 5; (Epub ahead of print)
 122. USDA (United States Department of Agriculture) APHIS– Servicios Veterinarios. 2003. Hoja informativa – Enfermedad exótica de Newcastle.
http://www.aphis.usda.gov/vs/birdbiosecurity/Downloads/PDF/fs_ahend_sp.pdf
 123. VARGAS, J. 2003. Patogenicidad y Respuesta Serológica de las Tórtolas (*Eupelia cruziana*) frente a un virus de la Enfermedad de Newcastle. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
 124. VILLEGAS, P; AVELLANEDA, G. 1995. Enfermedad de Newcastle. En: II Seminario Técnico Avícola – Simposio de Salmonella enteritidis, del 6 – 19 de mayo. Santa Cruz – Bolivia. Pgs 161-165.
 125. VILLEGAS, P. 1998. Avian Virus Disease, Laboratory Manual. Collage of Veterinary Medicine. The University of Georgia, Atlanta. pgs 39-43.
 126. VILLEGAS, P. 2003. La enfermedad de Newcastle: Situación actual, prevención y control. En: Primera Reunión Internacional de Sanidad Invetsa – Merial. 03 abril. Ica. Perú.

127. WAKAMATSU, N; KING, D; SEAL, B; PEETERS, B; SAMAL, S; BROWN, C. 2004. The use of infectious clones to examine contributions of various genes to virulence of Newcastle disease virus. En: 141st AVMA Annual Convention. July 24-28. Philadelphia, PA.
128. WAKAMATSU, N; BROWN, C; KAPCZYNSKI, D; SEAL, B; KING, D. 2004. Experimental Virulence Assessment of exotic Newcastle disease virus from an outbreak in California during 2002-2003 for chickens, turkeys and pigeons. En: AAAP/AVMA Scientific Program. July 2004. Philadelphia, Pennsylvania. pg. 83.
129. WANG, Z; VREED, F; VILJOEN, G. 2000. Rapid identification of Newcastle disease virus isolates by one step RT-PCR. En: XXI World's Poultry Congress. 20-24 August. Montreal - Canada
130. WEI, P; WEI, T; YANG, Z; LI, L; HUANG, L; LIU, L; MO, M; LI, K. 2005. A study of the virulence and the associated genes of avian paramyxovirus type 1 isolates originated from different avian species. En: 14th World Veterinay Poultry Congress. 22-26 August. Istambul – Turkey. pg: 221
131. WISE, M; SUAREZ, D; SEAL, B; PEDERSEN, J; SENNE, D; KING, D; KAPCZYNSKI, D; SPACKMAN, E. 2004. Development of a real-time reverse transcriptase transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. Journal of Clinical Microbiology. Jan 2004 p. 329-358.
132. WPT. WORLD PARROT TRUST. 2004. La mortal enfermedad de Newcastle descubierta en loros y otras aves importadas de Pakistan a Italia: 4,000 aves sacrificadas, las autoridades internacionales no han sido notificadas aún. 29 Feb. (Consulta 08/05)
http://www.worldparrottrust.org/news/end/pr29feb2004_spanish.htm
133. YANAYACO, A. 1995. Entwicklung und strukturen der geflügelhaltung in Peru mit einem beitrage zu vorkommen, bedeutung und charadterisierung von Paramyxoviren beim vogel in Peru. Tesis para optar el título de Doctor en Medicina Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria: Universidad de Gießen.
134. YU, L; WANG, Z; JIANG, Y; CHANG, L; KWANG, J. 2001. Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. Journal of Clin Microbiol Oct; 39:3512-3519
135. YOUNG, M; ALDERS, R. G. 2000. Informe del taller sobre el control de la enfermedad de Newcastle en pollos de poblados. Instituto Nacional de Investigaciones Veterinarias – Mozambique. INFPD Newsletter vol. 10 N° 1 y 2. Ene – Jul 2000.
<http://www.fao.org/ag/aga/agap/lpa/fampo1/infpd101es.htm> (Consulta 09/05)

ANEXO 1

GENOMA COMPLETO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE – CEPA B1

(Sellers et al, 2000)

1 accaaacaga gaatctgtaa ggtacgataa aaggcgaagg agcaatcgaa gtcgtacggg
61 tagaagggtg gaatctcgag tgcgagcccg aagctcaaac tcgagagagc cttctgccaa
121 aatgtcttct gtattcgatg agtacgagca gctcctcgcg gtcagactc gcccacatgg
181 agctcatggc ggaggagaga aggggagcac cttaaaagta gaagtcccg tattcactct
241 caacagtgat gaccagaag atagatggaa ttttgagta tttgtcttc ggattgctgt
301 tagcgaggat gccaacaaac cacttaggca aggtgctctc atatctctct tatgctctca
361 ctctcaagtg atgaggaacc atgttgcctt tgcggggaaa cagaatgagg ccacactggc
421 tgttcttgag atcgatgggt ttaccaacgg cgtgccccag ttcaacaaca ggagtggagt
481 gtctgaagag agagcacaga gattcatgat gatagcaggg tctcttctc gggcatgcag
541 caacggtacc ccgttcgta cagctgggg tgaagatgat gcaccagaag acattactga
601 taccctggag aggatctct ctatccaggc tcaagtatgg gtcacggtgg caaaggccat
661 gactgcatat gagacagcag atgagtcaga aacaagaaga atcaataagt acatgcagca
721 aggcagggtc cagaagaagt acatcctcca ccccgatgc aggagcgcaa tccaactcac
781 aatcagacag tctctggcgg tccgcatctt cttggttagc gagcttaaga gaggccgcaa
841 caggcaggt gggacctcca cctattacaa cttggtaggg gatgtagact catacatcag
901 gaacactggg ctaactgcat tcttctgac acttaatat ggaattaaca ccaagacatc
961 agcccttgca cttagcagcc tctcaggcga tatcaaaaa atgaagcagc tcatgcgctt
1021 gtatcggatg aaaggagata atgcgccgta catgacattg cttggtgaca gtgaccagat
1081 gagctttgca cctgccgagt atgcacaact ttactcctt gccatgggta tggcatcagt
1141 cctagataaa ggaactggca aataccaatt tgccagggac tttatgagca catcattctg
1201 gagacttga gtagagtacg ctacggctca aggaagtagc atcaatgagg atatggccgc
1261 cgagctaaag ctaacccag cagcaaggag aggcctggca gctgctgcc aaagagtgtc
1321 tgaggagacc agcagcatag acatgccac ccaacaagcc ggggtcctca ctggactcag
1381 cgacggaggt tccaagccc ccaagggtc actgaacaga tcacaagggc aaccggacac
1441 cggggatggg gagaccaat ttctggatct gatgagagcg gtggcaaata gcatgagaga
1501 agcgccaaac tctgcgagg gcacccctca accggggcct ccccaactc ctgggcccctc
1561 tcaagacaat gacaccgact ggggtactg accgacaaca cccagcctgc ttccatgaaa
1621 tcatccaac tctctgccc gcacccacc cctcaatccg caatcccga tggccaaacc
1681 cacaacgaa ccccttgct tccctctct ccctcagccc cacaaccca cctgccagg
1741 gcaacatagg cacaatgcga cccactaata atcaatacag ggccaaagaa attagaaaaa
1801 agtacgggta gaaggagac attcagagat cagggcgagt caccgggtc tctgctctcc
1861 cttctaccta gtggaccagg gtgaagatgg ccacctttac agatgcggag atcgacgagc
1921 tatttgagac cagtgaact gtcattgaca gcataattac ggccaggga aaaccagtag
1981 agaccgttg aaggagtga atcccacaag gcaaaactaa ggcttgagc gcagcatggg

2041 agaagcacgg gagcgtccag tcaccagcca gccaggacac ccctgaccgg caggacagat
 2101 cagataaaca actgtccaca cccgagcaag cgagtcaaaa cgacagcccg ccagccacat
 2161 ccactgacca gccccctact caggctgcag atgaagccgg cgacacacag ctcaggaccg
 2221 gagcaagcaa ctctctgctg tcgatgcttg ataaactcag caataagtca tctaagtcta
 2281 aaaagggccc atggctgagc cctcaagaag ggcatcatca acgtctgact caacaacagg
 2341 ggagtcaacc aagccgcgga aacagtcaag agagaccgca gaaccaggcc aaggctcatcc
 2401 ctggaaacct ggtcacagac gcgaacacag catatcatgg acaatgggag gggtcacaac
 2461 tatcagctgg tgcaaccct catgtctcc gatcagagca gagccaagac aatactcctg
 2521 cacctgtgga tcattgtccag ctactgtcg actttgtgca ggcgatgatg tctatgatgg
 2581 aggcgatatc acagagggta agtaaagttg actatca

Aminoácidos y sus abreviaciones:

- | | | |
|-------------------|----------------|------------------|
| ▪ Alanina: A | ▪ Leucina: L | ▪ Triptófano: W |
| ▪ Fenilalanina: F | ▪ Glutamina: Q | ▪ Glutámico: E |
| ▪ Lisina: K | ▪ Valina: V | ▪ Isoleucina: I |
| ▪ Prolina: P | ▪ Aspártico: D | ▪ Asparragina: N |
| ▪ Treonina: T | ▪ Histidina: H | ▪ Serina: S |
| ▪ Cisteína: C | ▪ Metionina: M | ▪ Tirosina: Y |
| ▪ Glicina: G | ▪ Arginina: R | |

Gen NP (Proteína de la Nucleocápside)

Traducción: "MSSVFDEYEQLLAAQTRPNGAHGGGEKGSTLKVDVPVFTLNSDD

PEDRWSFVVFCLRIAVSEDANKPLRQGALISLLCSHSQVMRHNHVALAGKQNEATLAVL
 EIDGFANGTPQFNNRSGVSEERAQRFAMIAGSLPRACSNTPFVTAGAEDDAPEDITD
 TLERILSIQAQVWVTVAKAMTAYETADESETRINKYMQQGRVQKKYILYPVCRSTIQ
 LTIRQSLAVRIFLVSELKRGRNTAGGTSTYYNLVGDDSYIRNTGLTAFFLTLYGIN
 TKTSALALSSLSGDIQKMKQLMRLYRMKGDNAPYMTLLGSDQMSFAPAQYLYSFA
 MGMAVLDKGTGKYQFAKDFMSTSFWRLGVEYAQAQGSSINEDMAAELKLTPAARRGL
 AAAAQRVSEVTSSIDMPTQQVGVLTGLSEGGSQLQGGSNRSQGQPEAGDGETQFLDL
 MRAVANSMREAPNSAQGTPQSGPPPTGPSQDNDTDWGY"

Gen P (Fosfoproteína)

Traducción: "MATFTDAEIDELFETSGTVIDNIITAQGKPAETVGRSAIPQGKT

KVLAAWEKHGSIQPPASQDNPDQRDRSDKQPSTPEQTTPHDSPPATSADQPPTQATD
 EAVDTQLRTGASNSLLLMLDKLSNKKSPWSSPQEGNHQRPTQQQGSQPSRGNS

QERPQNQVKAAPGNQGTDVNTAYHGQWEESQLSAGATPHGLRSKQSQNNTPVSADHFFH

PPVDFVQAMMSIMEGISQVRVSKVAYQVDLVFKQTSSIPMMGSEIQQLKTFVAVMEANL
 GMMKILDPGCANISSLSDLRAVARSHPVLSVSGPDSPYVIQGGEMALNKLSPVPHF

SELIKPATACGPDIGVERDTRALIMSRPMHPSSSAKLLSKLDAAGSIEEIRKIKRLA
LNG"

Gen M (Proteína Matriz)

Traducción: "MDSRTIGLYFDSAHSNNLLAFPIVLQDTGDGKKQIAPQYRIQ

RLDLWTDKEDSVFITYGFIFQVGNEEATVGIIDDKPKRELLSAAMLCLGSVPNTGD
LIELARACTMMVTCKKSATNTERMVFSVQAPQVLQSCRVVANKYSSVNAVKHVKAP
EKIPGSGTLEYKVNFSVLTVPKKDVYKIPAAVLKISGSSLYNLALNVTINVEVDPRS
PLVKSLSKSDSGYYANLFLHIGLMTTVDRKGKKVTFDKLEKKIRSLDLSVGLSDVLGP
SVLVKARGARTKLLAPFFSSSGTACYPIANASPQVAKILWSQTACLRSVKIIIQAGTQ
RAVAVTADHEVTSTKLEKGHTLAKYNPFKK"

Gen F (Proteína de Fusión)

Traducción: "MGRPFTKNPAPMMLTIRVALVLSICPANSIDGRPFAAAGIVV

TGDKAVNIYTSSQTGSIIVKLLPNLPKDKEACAKAPLDAYNRTLTTLLTPLGDSIRRI
QESVTTSGGGRQGRLIGAIIGGVALGVATAAQITAAAALIQAKQNAANILRLKESIAA
TNEAVHEVTDGLSQLAVAVGKMQQFVNDQFNKTAQELDCIKIAQQVGVELNLYLTETL
TVFGPQITSPALNKLTIQALYNLAGGNMDYLLTKLGIGNNQLSSLIGSGLITGNPILY
DSQTQLLGIQVTLPSVGNLNNMRATYLETSLVSTTRGFASALVPKVVTQVGSVIEELD
TSYCIETDLPLYCTRIVTFPMSPGIYSCLSGNTSACMYSKTEGALTTPYMTIKGSVIA
NCKMTTCRCVNPPGIISQNYGEAVSLIDKQSCNVLSLGGITLRLSGEFDVTYQKNISI
QDSQVIITGNLDISTELGNVNNSISNALNKLEESNRKLDKVNVLKLTSTSAITYIVLT
IISLVFGILSLILACYLMYKQKAQKTLWLGNNTLDQMRATTKM"

Gen HN (Hemaglutinina-Neuraminidasa)

Traducción: "MDRAVSQVALENDEREAKNTWRLIFRIAILFTVVTLAISVASL

LYSMGASTPSDLVGIPTRISRAEKITSTLGSNQDVVDRIYKQVALESPLALLNTETT
IMNAITSLSYQINGAANNSSGWGAPIHDPDYIGGIGKELIVDDASDVTSFYPSAFQEHL
NFIPAPTTGSGCTRIPSFDMSTHYCYTHNVILSGCRDHSYQYLALGVLRTSATGR
VFFSTLRSINLDDTQNRKSCSVSATPLGCDMLCSKATETEEEDYNSAVPTRMVHGRLG
FDGQYHEKDLDTTLFGDWVANYPGVGGGSFIDSRVWFSVYGGLKPNSPSDTVQEGKY
VIYKRYNDTCPDEQDYQIRMAKSSYKPRFGGKRIQQAILSIVSTSLGEDPVLTVPP
NTVTLMGAEGRILTVGTSHFLYQRGSSYFSPALLYPMTVSNKTATLHSPYTFNAFTRP
GSIPCQASARCPNSCVTVGYTDPYPLIFYRNHTLRGVFGTMLDGEQARLNPASAVFDS
TSRSRITRVSSSSIKAAYTTSTCFKVKTNKTYCLSAEISNTLFGFRIVPLLVEIL
KDDGVREARSG"

Gen L (Proteína polimerasa grande)

Traducción: "MASSGP ERAEHQIILPESHLSSPLVKHKLLYYWKLTLGLPLPDEC

DFDHLILSRQWKKILESASPDTERMIKLGRAVHQTLNHNSTRITGVLHPRCLEELANIE
VPDSTNKFRKIEKKIQIHNTRYGELFTRLCTHIEKKLLGSSWSNNVPRSEEFSSIRTD
PAFWFHSKWSTAKFAWLHIKQIQRHLIVAARTRSAANKLVMLTHKVGQVFVTPELVVV
THTNENKFTCLTQELVLMYADMMEGRDMVNIISTTAVHLRSLSEKIDDLRLDALAK
DLGNQVYDVVSLMEGFAYGAVQLLEPSGTFAGDFFAFNLQELKDILIGLLPNDAESV
THAIATVFSGLEQNQAAEMLCLLRLWGHPLLESRIAANKAVRSQMCAPKMVD FDMILQV
LSFFKGTTIINGYRKKNAGVWPRVKVDTIYGKVIQQLHADSAEISHDIMLREYKLSLAL
EFEPCIEYDPVTNLSMFLKDKAIAHPNDNWLASFRRNLLSEDQKKHVKEATSTNRLLI
EFLESNDFDPYKEMEYLTITLEYLRDDNVAVSYSLKEKEVKVNGRIFAKLTKKLRNCQV
MAEGILADQIAPFFQGNQVQISISLTKSMLAMSQLSFNSENKKRITDCKERVSSNRNH
DPKSKNRRRVATFITDLQKYCLNWRYQTIKLFHAHAINQLMGLPHFFEWIHLRLMDTT
MFVGDPFNPPSDPTDCDLSRVPNDIYVSARGGIEGLCQKLWTMISIAAIQLAAARS
HCRVACMVQGDNQVIAVTREVRSDDSPENVLTQLHQASDNFFKELIHNHLIGHNLKD
RETIRSDTFFIYSKRIFKDGAILSQVLKNSSKLVVSGDLSENTVMSCANIASTVARL
CENGLPKDFCYLLNYIMSCVQTYFDSEFSITNNSHPDLNQSWIEDISFVHSYVLTPAQ
LGGLSNLQYSRLYTRNIGDPGTTAFAEIKRLEAVGLLSPNIMTNILTRPPGNGDWASL
CNDPYSFNFETVASPNIVLKKHTQRVLFETCSNPLLSGVHTEDEAEKALAEFLNQ
EVIHPRVAHAIMEASSVGRRKQIQGLVDTTNTVIKIALTRRPLGIKRLMRIVNYSSMH
AMLFRDDVFSSRSNHLVSSNMCSLTADYARNRSWSPLTGGRKILGVSNPDITELV
EGEILSVSGGCTRCDSGDEQFTWFHLP SNIELTDDTSKNPPMRVPYLGSKTQERRAAS
LAKIAHMSPHVKAALRASSVLIWAYGDNEVNWTAALTIKSRNCNVNLEYLRLLSPLPT
AGNLQHRLLDDGITQMTFTPASLYRCHLTFTYPMILKGCSLKESKRGMWFTNRVMLLG
LSLIESIFPMTTTRTYDEITLHLHSKFSCCIREAPVAVPFELLGVAPELRTVTSNKF
YDPSVSEGD FARLDAIFKSYELNLESYPTIELMNILSISSGKLIGQSVVSYDEDT
IKNDIAIIVYDNTRNWISEAQNSDVVRLFEYAALEVLLHRSYQLYYLRVRGLDNIVLYM
GDLYKNMPGILLSNIAATISHPVIHSRLHAGLVNHDGSHQLADTDFIEMSAKLLVSC
TRRVISGLYSGNKYDLLFPSVLDDNLNEKMLQLISRLCCLYTVLFATTREIPKIRGLT
AEEKCSILTEYLLSDAVKPLLPDQVSSIMSPNIITFPANLYYMSRKS LNLIREREDR
DTILALLFPQEPLLEFPSVQDIGARVKDPFTRQPA AFLQELDLSAPARYDAFTLSQIH
PELTSPNPEEDYLVRYLFRGIGTASSSWYKASHLLSVPEVRCARHGNSLYLAEGSGAI
MSLLELHVPHEIYYNTLFSNEMNPPQRHFGPTPTQFLNSVVYRNQLAEVTCKDGFVQ
EFRPLWRENTESDLTSDKAVGYITSAPYRSVSLHCDIEIPPGSNQSLLDQLAINL
SLIAMHSVREGGVVIAKLYAMGYFHLLMNLFAPCSTKG YILSNGYACRGDMECYLV
FVMGYLGGPTFVHEVVRMAKTLVQRHGTL LSKSDEITLTRLFTSQRQRVTDILSSPLP
RLIKYLRKNIDTALIEAGGQVPRPFCAESLVSTLANITQITQIIASHIDTVIRSVIYM
EAEGDLADTVFLFTPYNLSTDGKKRTSLKQCTRQILEVTILGLRVENLNKIGDIISLV
LKG MISMEDLIPLRTYLKHSTCPKYLKAVLGITKLKEMFTDTSVLYLTRAQQKFYMK
TIGNAVKGYYSNCD"

ANEXO 2

INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI)

Detección de anticuerpos contra el vENC mediante HI (Alexander, 1989; OIE, 2004)

- En cada una de las celdillas de la microplaca se coloca, con una micropipeta, 25 μ l de suero fisiológico tamponado.
- Utilizando una micropipeta se adiciona 25 μ l de las muestras de suero de las aves a cada una de las 11 celdillas de la primera hilera de cada placa dejando una para el control negativo.
- Haciendo uso del dilutor de 25 μ l se mezcla el contenido y se pasan 25 μ l a la segunda hilera de celdillas, mezclando y volviendo a pasar a la tercera hilera, prosiguiendo sucesivamente hasta el término de la microplaca, obteniendo diluciones seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, sucesivamente hasta 1:256.
- Luego se agrega 25 μ l de antígeno conformado por el virus de la enfermedad de Newcastle con 4 HAU. **(Anexo 2.1)**
- Se deja incubar a temperatura ambiente por 30 minutos para obtener la reacción antígeno- anticuerpo.
- Al final del periodo de incubación se adiciona 25 μ l de glóbulos rojos al 0.75%. **(Anexo 2.2)**
- Se mezcla bien agitando las bandejas.
- Se deja incubar las placas al medio ambiente por un periodo de 45 a 60 minutos.
- Pasado este periodo se procede a la lectura visual de los resultados. **(Anexo 2.3)**
- La aglutinación se mide mediante la inclinación de la microplaca. Sólo se considera que muestran inhibición aquellas celdillas en las que los glóbulos rojos discurren de la misma manera que en la celdilla control.
- Reacción positiva: esta dada por la formación de un botón en el fondo de la placa, este botón esta compuesto por glóbulos rojos no aglutinados debido a la presencia de anticuerpos en el suero.



- Reacción negativa: esta dada por la formación de una malla en el fondo de la placa debido a la ausencia de anticuerpos en el suero que impidan la aglutinación de eritrocitos por el antígeno viral.



- Se considera el título HI a la mayor dilución de suero que ocasiona una completa inhibición de 4 HAU del antígeno.

Anexo 2.1

PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO

Preparación del antígeno siguiendo la técnica empleada por Villegas (1998).

- Se restituye una vacuna liofilizada de la Enfermedad de Newcastle, cepa La Sota, de una presentación de 1000 dosis, con 30ml. de solución tamponada estéril.
- De la solución obtenida se inocula 0.2ml. en la cavidad alantoidea de embriones de 9 a 11 días de edad.
- Los embriones se incuban a 37°C por 7 días, descartando los embriones muertos las primeras 24 horas.
- Los embriones que murieron pasadas las 24 horas se enfrían a 4°C, obteniéndose así el fluido alantoideo, el que posteriormente se titula.

Titulación del líquido alantoideo mediante la prueba de microtitulación, a fin de determinar el título hemaglutinante del líquido alantoideo.

- Con una micropipeta, se coloca 25µl de suero fisiológico en cada celdilla de una placa de microtitulación con fondo en U.
- Se coloca 25 µl de fluido alantoideo en la primera hilera, dejando las dos últimas celdas para el control negativo de celdillas.
- Empleando microdilutores de 25 µl se procede a mezclar el suero fisiológico y fluido alantoideo de la primera fila y a transferir a continuación 25 µl a la segunda hilera, continuando con este procedimiento hasta la última fila de la placa.

- Se adiciona una suspensión de glóbulos rojos al 0.75% a cada una de las celdillas de la placa, incluyendo las del control negativo.
- Se deja incubar a temperatura ambiente por 30 min. aproximadamente.
- Las celdas de control negativo forman el botón rojo característico a consecuencia de la sedimentación de glóbulos rojos.
- Las celdillas que contienen las diluciones del líquido alantoideo presentarán hemoaglutinación de los glóbulos rojos.
- Al realizarse la lectura, se evalúa hasta qué número de hilera hemaglutina el líquido alantoideo. Por ejemplo si el virus hemaglutinase hasta la octava hilera, el resultando sería que dicho virus tiene 256 HAU (1:256)

Preparación del antígeno para una concentración de 4 HAU.

- De la solución obtenida, se procede a realizar su dilución a fin de obtener una concentración de 4 HAU (1:4)
- Se procede a dividir la concentración máxima de HAU (para este ejemplo 256) entre 4, que son las unidades con las que se busca trabajar ($256/4 = 64$)
- Esto significa que de cada 64 ml. de antígeno a preparar, 1 ml. será de líquido alantoideo y 63 ml. será suero tamponado.
- Obtenida esta solución, se procede a titularla para confirmar la concentración, y posteriormente se procede a congelarla.

Anexo 2.2

PREPARACIÓN DE GLÓBULOS ROJOS

Preparación de glóbulos rojos empleando el método de Villegas (1998)

Materiales:

- Pollos de más de 5 semanas de edad.
- Jeringa estéril de 10 ml.
- Agujas de 20 x 1 ½ pulgada
- 3 ml. de anticoagulante (citrato de sodio al 2%)

Procedimiento:

- Se recolecta sangre por punción cardíaca de 3 a 5 pollos, aspirando la sangre con la jeringa estéril (conteniendo el anticoagulante) hasta completar 10 ml.

- Se mezcla la sangre y el anticoagulante (ambos en la jeringa) suavemente, a fin de obtener una mezcla homogénea y evitar hemólisis.
- La sangre se trasvasa a un tubo de centrífuga y se procede a centrifugarlo por 5 minutos a 1500 rpm.
- Se descarta el sobrenadante.
- Los glóbulos rojos se resuspenden al volumen original con una solución de suero fisiológico, se mezclan y centrifugan, este procedimiento se repite 4 veces.
- Después del último lavado, la suspensión de glóbulos rojos se suspende con una solución de suero fisiológico a una concentración al 0.75%.
- La solución resultante se refrigera hasta su empleo como máximo por 3 días.

Anexo 2.3

PROMEDIO GEOMÉTRICO DE TÍTULOS (PGT)

Promedio geométrico utilizando la tabla desarrollada por Brugh (1982).

- Dependiendo de la dilución original utilizada (1/20) y del valor promedio obtenido de todas las muestras, el número entero se busca en la tabla en una de las tres columnas de la izquierda, y la fracción decimal se localiza en la parte superior de las 9 columnas restantes.
- Entonces en la tabla se busca el número entero en la columna para la dilución 1/20 y la fracción decimal (en caso que existiera), en la parte superior de las columnas de la derecha, el resultante se divide entre 10, siendo este el promedio geométrico de títulos que corresponde (PGT).
- Por ejemplo, si fueran 15 muestras de suero y se obtuvieran los siguientes resultados:
 3 muestras con el punto final de dilución 4
 6 muestras con el punto final de dilución 3
 6 muestras con el punto final de dilución 1
 ó $3(1/16)$, $6(1/8)$, $6(1/2)$
 Se calcula el promedio: $(3 \times 4) + (6 \times 3) + (6 \times 1) = 36$; $36/15 = 2.4$
 Entonces en la tabla se busca el número entero dos (2), en la columna para la dilución 1/20 y el 0.4 en la parte superior de las columnas de la derecha, el resultante se divide entre 10, siendo este el PGT que en este caso corresponde a 5.3.
- En el caso de realizar la prueba de HI y de no encontrar niveles de anticuerpos, el punto final de dilución es uno, por lo tanto el promedio geométrico de títulos (PGT) siempre es 2.

Conversión de títulos promedio (logaritmo base 2) a promedio geométrico de títulos (GMT)*

Título promedio (a)			Recíproco de GMT a distancias proporcionales entre diluciones									
1/5 (b)	1/10	1/20	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
1			5	5	6	6	7	7	8	8	9	9
2	1		10	11	12	12	13	14	15	16	17	19
3	2	1	20	21	23	25	26	28	30	32	35	37
4	3	2	40	43	46	49	53	57	61	65	70	75
5	4	3	80	86	92	98	106	113	121	130	139	149
6	5	4	160	171	184	197	211	226	243	260	279	299
7	6	5	320	343	368	394	422	453	485	520	557	597
8	7	6	640	686	733	788	844	905	970	1040	1114	1194
9	8	7	1280	1372	1470	1576	1689	1810	1940	2079	2229	2389
10	9	8	2560	2744	2941	3152	3378	3620	3880	4159	4457	4777
11	10	9	5120	5487	5881	6303	6756	7241	7760	8317	8914	9554
12	11	10	10240	10975	11763	12607	13512	14482	15521	16635	17829	19109
13	12	11	20480	21950	23525	25214	27024	28963	31042	33270	35658	38217
14	13	12	40960	43900	47051	50428	54047	57926	62084	66540	71316	76434
15	14	13	81920	87800	94101	100856	108094	115852	124168	133079	142631	152868
16	15	14	163840	175599	188203	201711	216188	231705	248335	266159	285262	305736

a= Promedio del punto final de titulación expresado por la dilución o número de tubo

b= Dilución del material en prueba (suero, etc.) en el primer tubo en series al cuadrado. Para pruebas con una dilución inicial de 1/2, utilizar la columna 1/20 y dividir el resultado entre 10.

* Preparado por Max Brugh (Athens, Georgia).

ANEXO 3

ADSORCIÓN DEL SUERO CON GLÓBULOS ROJOS DE POLLO

Para evitar la aglutinación de glóbulos rojos de pollo al analizar sueros provenientes de especies distintas a esta, se recomienda remover esta propiedad por la adsorción del suero con glóbulos rojos de pollos (OIE, 2004):

- ✓ Se añaden 0.025 ml. de glóbulos rojos de pollos compactados a cada uno de los 0.5 ml. de antisuero.
- ✓ Se mezcla suavemente y se deja por lo menos 30 minutos.
- ✓ Luego esta mezcla se centrifuga a 800 g. por 2 a 5 minutos para lograr un pellet con los glóbulos rojos.
- ✓ Finalmente el suero adsorbido se decanta.

ANEXO 4

LISTA ÚNICA DE ENFERMEDADES NOTIFICABLE ANTE LA OIE (OIE, 2004b)

Enfermedades Aviares

1. Bronquitis infecciosa aviar
2. Laringotraqueítis infecciosa aviar
3. Tuberculosis aviar
4. Hepatitis viral de los patos
5. Enteritis viral de los patos
6. Cólera aviar
7. Viruela aviar
8. Tifoidea aviar
9. Enfermedad de Gumboro
10. Enfermedad de Marek
11. Micoplasmosis aviar (*M. gallisepticum*)
12. Clamidiosis aviar
13. Pulorosis
14. Influenza aviar altamente patógena
- 15. Enfermedad de Newcastle**